



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, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2019
Cilt / Volume : 16
Sayı / Number : 1

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

E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Nisan 2019

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. Dr. İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

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

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ali AYDIN (İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

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

Assoc. Prof. Dr. Corneliu BRASLASU (Univ. Agricultural Sci. Vet. Med, Bucharest)

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

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

Prof. Dr. Gediminas VALKIUNAS (Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

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

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

Assist. Prof. Dr. Klaus RIEDELBERGER (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ (Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak.)

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

Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY (Erciyes Üniv. Tıp Fak.)

Prof. Dr. Mustafa GARİP (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

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

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

Prof. Dr. Oğuz KUL (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oktay GENÇ (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Özcan ÖZGEL (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Rahşan ÖZEN (Fırat Üniv. Vek. Fak.)

Prof. Dr. Sinan AKTAŞ (Atatürk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Staffan BENSCH (University of Lund, Lund, Sweden)

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI (Balıkesir Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak.)

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

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

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

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

Effect of Detomidine-Butorphanol-Ketamine and Atipamezole on Clinical, Cardiorespiratory, Haematological Parameters in Sheep	1
Koyunlarda Detomidin-Butarfanol-Ketamin ve Atipamezol'ün Klinik, Kardiyorespiratorik, Hematolojik Parametreler Üzerine Etkileri G. ATALAN, G. ATALAN, V. GUNEŞ, Z. OKUMUS, H.EROL, F. CELEBI, A. C. ONMAZ	
Kuluçka Sonrası İlk İki Haftada Lipopolisakkarit Uygulanan ve Uygulanmayan Broylar Civcivlerde Dalağın Histolojik Gelişimi	8
The Histological Development of the Spleen in Broiler Chicks Treated with and without Lipopolysaccharide in the First Two Weeks of the Post-Hatch Period E. AKA, Ü. EREN	
Mısır Silajına Farklı Oranlarda Antep Fıstığı (<i>Pistacia vera</i> L.) Dış Kabuğu İlavesinin Silaj Kalitesi ve İn Vitro Metan Gazı Oluşumu Üzerine Etkisinin Araştırılması	16
Investigation of Effect on Silage Quality and In Vitro Methane Gas Formation of Pistachio (<i>Pistacia vera</i> L.) Outer Shell with Additional at Different Levels in Corn Silage E. PAYDAŞ, Z. SAVRUNLU, M. SAVRUNLU, N. DENEK	
The Inhibition Effects of Eugenol and Pulegone on <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>: An Opportunistic Pathogen	23
Eugenol ve Pulegon'un Fırsatçı Patojen Bir Bakteri Olan <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ya Karşı İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi T. BAYGAR, N. SARAC, A. UGUR, T. BAYGAR, U. BALCI	
Rat Epididimal Spermasının Kısa Süreli Saklanması Farklı Sıcaklık Dereceleri ve Karnitin Etkileri	30
The Effect of Different Temperature and Carnitine In Liquid Storage of Rat Epididymal Semen Rat epididimal spermasının saklanması M. YEŞİL, S. SARIÖZKAN	
Determination of Hepatitis A Virus, Enterobacteriaceae, Coliform and <i>Escherichia coli</i> Contamination of Frozen Raspberries	38
Dondurulmuş Ahududularda Hepatit A Virüs, Enterobacteriaceae, Koliform ve <i>Escherichia coli</i> Kontaminasyonunun Belirlenmesi G. K. İNCİLİ, A. KOLUMAN, A. DİKİCİ	

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

Türkiye'de Hayvancılıkta İhmal Edilen Bir Disiplin: Çiftlik Hayvanlarına Değer Takdiri	43
A Neglected Discipline in Livestock in Turkey: Appraisal to Farm Animals G. KESKİN	
Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	49
Apitherapy and Effect on Human Health D. ONBAŞLI, G. YUVALI ÇELİK, S. KAHRAMAN, M. KANBUR	
Kısraalarda Doğum Sonrası Metritisin Sebepleri ve Tedavisi	57
The Causes and Therapy of Postpartum Metritis in Mares Y. AKAR	
Rotavirus Enfeksiyonunun Moleküler Patogenezi	60
Molecular Pathogenesis of Rotavirus Infection Z. AKKUTAY YOLDAR, F. ALKAN	
Bruselloz Tanısı ve Epidemiyolojik Çalışmalarda Moleküler Yöntemlerin Kullanılması	68
Molecular Methods Applications in Brucellosis Diagnosis and Epidemiological Studies O. GENÇ, G. SERDAR	

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

Chocolate Intoxication in a Budgerigar	73
Bir Muhabbet Kuşunda Çikolata Toksikasyonu K. VAROL, G. EKİNCİ, V. GÜNEŞ, İ. KELEŞ, A. C. ONMAZ	



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
16(1), 1-7, 2019
DOI:10.32707/ercivet.538035

Effect of Detomidine-Butorphanol-Ketamine and Atipamezole on Clinical, Cardiorespiratory, Haematological Parameters in Sheep

Gültekin ATALAN¹, Güneri ATALAN² Vehbi GUNEŞ³, Zafer OKUMUS⁴, Hanifi EROL¹, Fikret CELEBİ⁵, Ali Cesur ONMAZ³

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, Kayseri-TURKEY

²Medical Park Hospital, Department of Anaesthesiology, Elazığ-TURKEY

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

⁴Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, Erzurum-TURKEY

⁵Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Erzurum-TURKEY

*Corresponding author: Gültekin ATALAN; E-mail: gulty@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-2613-5638

How to cite: Atalan G, Atalan G, Güneş V, Okumus Z, Erol H, Çelebi F, Onmaz AC. Effect of detomidine butorphanol-ketamine and atipamezole on clinical, cardiorespiratory, haematological parameters in sheep. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 1-7.

Summary: The aim of this study was to evaluate the sedative-anesthetic effects of detomidine (D) 30 µg/kg, intramuscular (IM), butorphanol (B) 0.2 mg/kg IM and ketamine (K) 5 mg/kg, IM combination in sheep. Five female and nine male healthy (1-2 years old) Akkaraman sheep were used as animal material. Detomidine and butorphanol were used to produce sedation. Ten minutes later K was administered for anaesthesia. The anaesthetic effect of the drugs was reserved by atipamezole (AT) 30 µg/kg, IM administration at 30 minutes after K injection. The sedative effects of DB demerged in 3 minutes after injection and anaesthetic effects (by the lack of pain stimuli) were visible in 5 minutes after K injection. Heart rate, body temperature and amplitude P values significantly decreased until the administration of AT. Contrarily, respiratory rate, PR interval and R amplitude values increased during anaesthesia. Partial venous oxygen pressure (PO₂) and Partial venous carbon dioxide pressure (PCO₂) values decreased during anaesthesia. There were no significant alterations seen for hematological parameters including hemoglobin (Hg), white blood cell (WBC), red blood cell (RBC) and hematocrit (Ht) values in sheep. As a result, BDK anaesthetic combination depresses the cardiorespiratory system but produces adequate sedation and anaesthesia for sheep. AT can be safely used for this anaesthetic combination in sheep.

Key words: Butorphanol, detomidine, ketamine, sheep

Koyunlarda Detomidin-Butarfanol-Ketamin ve Atipamezol'ün Klinik, Kardiyorespiratorik, Hematolojik Parametreler Üzerine Etkileri

Özet: Bu çalışmanın amacı koyunlarda detomidin (D) 30µg/kg, intramüsküler (IM), butarfanol (B) 0.2 mg/kg, IM ve ketamin (K) 5 mg/kg, IM kombinasyonunun sedatif-anestezik etkilerinin değerlendirilmesidir. Beş dişi ve dokuz erkek (1-2 yaşlı) Akkaraman koyunu çalışma materyali olarak kullanıldı. Detomidin ve butarfanolün sedasyon için enjeksiyonundan 10 dakika sonra ketamin anestezi amacı ile uygulandı. Uygulanan anestezi 30 dakika sonunda atipamezol (AT) 30µg/kg IM uygulanarak kullanılan anaestezik ilaçların etkileri takip edildi. DB'ün sedatif etkisi enjeksiyonu takiben üç dakika sonra ve anestezik etki (ağrı uyarılarına tepki kaybı) K enjeksiyonundan beş dakika sonra görüldü. Kalp atımı, vücut ısısı ve P amplitüt değerlerinde AT enjeksiyonuna kadar önemli değişimler tespit edildi. Solunum sayısının aksine PR aralığı ve R amplitütleri anestezi süresince azalma gösterdi. Parsiyel venöz oksijen basıncı (PO₂) ve parsiyel venöz karbondioksit basıncı (PCO₂) değerleri anestezi süresince azalış gösterdi. Hemoglobin (Hg), lökosit (WBC), eritrosit (RBC) ve hematokrit (Ht) değerlerini içeren hematolojik parametrelerde önemli değişim görülmedi. Sonuç olarak, BDK anestezi kombinasyonunun kardiyorespiratorik sistemi baskıladığı fakat koyunlar için yeterli derecede sedasyon ve anestezi sağladığı görüldü. AT'ün koyunlarda bu anestezi kombinasyonu için güvenli bir şekilde kullanılabileceği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Butarfanol, detomidin, ketamine, koyun

Introduction

Different alpha-2 adrenoreceptor agonists (xylazine, detomidine, medetomidine, romifidine) are used for sedation and anaesthesia in animals. They have analgesic, sedative and muscle relaxation properties

(7,13). The use of ideal anaesthetic to reduce pain and limit suffering in animals is very important in veterinary practice (2,12).

Detomidine (D) is a selective alpha-2 adrenoreceptor agonist that produces reliable sedation and analgesia (19). It is a potent alpha-2 adrenoreceptor agonist, has approximately 10 times the binding selectivity of

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.02.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.02.2018

xylazine for alpha-2 receptors (3,11). It provides light to heavy sedation according to the dose administration. Use of this agent alone provides adequate sedation for premedication prior to general anaesthesia in sheep (8).

Butorphanol (B) is a synthetically opioid agonist-antagonist analgesic agent. It has minimal effects on the cardiopulmonary system in sheep (28). It performs its agonistic by inducing kappa receptors and antagonistic effects on mu receptors, which are responsible for opioid-induced respiratory depression (6).

Ketamine (K) is a dissociative anaesthetic which can be used intravenous (IV) or intramuscularly (IM) for induction of general anaesthesia (7,9). Use of K may result in muscle hypertonus, early and frequent spontaneous movement and convulsions. Therefore, it is usually necessary to administer other anaesthetic agents such as phenothiazine, or alpha-2 adrenoceptor agonists (xylazine, detomidine or medetomidine) (2,7,9).

Atipamezole (AT) is a selective alpha-2 adrenoceptor antagonist. It has reversible effects on the cardiovascular system and sedative effects of alpha-2 agonists (1,26).

In sheep various anaesthetic drugs are used alone or in combination for major surgery or prolonged diagnostic procedure including alpha-2 agonists, thiopental, K and tiletamine-zolazepam. Xylazine, D and medetomidine provide light to heavy sedation according to the dose rate administered. Use of these agents alone provides satisfactory sedation for restraint or premedication in sheep (8,11,12). Major surgery and prolonged diagnostic procedure in sheep is best performed under general anaesthesia. But general anaesthesia or heavy sedation can be complicated and life threatening for sheep. Sheep have four stomach configuration and the digestive process can be compromised when these animals are placed in either lateral or dorsal recumbency (8). The most important problem and disadvantage of general anaesthesia in sheep is hypoxaemia (8,13,15,23).

To our knowledge the Detomidine-Butarphanol-Ketamine (DBK) combination as an anaesthetic mixture has not been established in sheep. Therefore, the aim of the study were investigate the clinical and cardiorespiratory effects of DBK anaesthesia combination and to evaluate the effectiveness of AT to reverse DBK induced anaesthesia in sheep.

Material and Methods

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Kafkas (04/04). Fourteen healthy Akkaraman sheep (5 female and 9 male, 1-2 years old) weighing 50-70 kg (mean 59 kg) were

used as an animal material. They were housed in a sheep farm and kept under standard management condition with free access to feed and water. Antiparasitic drug (Albendazole, 10 mg/kg, intraoral, Vet A, Turkey) were given two weeks before the study. The animals were kept off feed a day and 12 h water prior the study. The left side of neck and pectoral regions were shaved and prepared for placement of catheters and electrodes.

Injectable combination of D (Domesedan, 10 mg/ml, Orion Corporation, Orion Pharma, Espoo site Orionintie 1, FIN-02200 Espoo, Finland, 30 µg/kg, IM) and B 0.2 mg/kg (Torbugesic, 10 mg/ml; Forte Dodge Animal Health, Southamtom, UK) were used to produce sedation. The drugs were diluted in 1 ml of 0.9% NaCl solution to ease the handling of small volumes and this volume injected by IM. After 10 min, K 5 mg/kg (Ketalar, 50 mg/kg ml; Eczacıbaşı, Istanbul, Turkey) was injected by IM. Thirty minutes later AT 30 µg/kg (Antisedan, Farnos Group, Turku, Finland in 1 ml 0.9% NaCl solution, IM) were prepared and injected in all sheep.

The following parameters were measured before and 10 min after pre-medication with D and B; 10, 20 and 30 min after injection of K during anaesthesia, and at 10 min following administration of AT. Heart rate (HR, beats/per min), respiratory rate (RR, breaths/per min) electrocardiograms (ECGs) obtained from extremity derivations and body temperature (BT) were measured at the above-mentioned time-intervals. The ECGs were recorded by a direct writing electrocardiograph (Logos 8821; Logos Medical Co. Ltd, Tokyo, Japan). All ECGs were standardized at 1 mV=10 mm, with chart speed of 50 mm/s. Leads I, II, III, aVR, aVL, aVF were determined. The duration and amplitude of waves on the trace were measured in lead II.

Ten millilitres of blood samples were collected from the left jugular vein. Hematologic analysis consisted of counting the number of WBC and RBC, packed cell volume (PCV) and measurement of Hg concentration. Venous blood gas analyses were also performed to determine the alterations at the level of PH, PO₂, HCO₃ and PCO₂ by using Rapidlab 248 (Chiron Diagnostics, USA) device analyser.

The recovery time of the sheep was determined as being when the animal regained all motor and sensory functions and, the time (min) until the animals spontaneously regained their feet (on-feet), standing and starting walking consciously after anaesthesia. Therefore, the effects of AT were evaluated by recording the time from injection until the animals were on feet, the time elapsing until resedation occurred. Resedation was evaluated in a more subjective manner by observing signs such as reduced alertness, head dropping or recumbency. Resedation was considered to have ended when the sheep became alert,

Table 1. Evaluation of sedation-anaesthesia quality for sheep anaesthetized by detomidine, butorphanol and ketamine combination and alteration following atipamezole administration

Sheep no	0 min	Pre 10. (min)	An 10. (min)	An 20. (min)	An 30. (min)	AT 10. (min)	Recovery Time (min)
1	0	++	++	+++	+	0	10
2	0	++	+++	+++	++	0	13
3	0	+	+++	+++	+	0	14
4	0	++	+++	+++	+	0	10
5	0	++	+++	+++	+	0	15
6	0	+	+++	+++	++	0	18
7	0	++	+++	+++	+	0	21
8	0	++	+++	+++	+	0	12
9	0	+	+++	+++	++	0	12
10	0	++	++	+++	+	0	10
11	0	+	+++	+++	+	0	14
12	0	++	+++	+++	+	0	12
13	0	++	+++	+++	++	0	13
14	0	++	+++	+++	+	0	12

Min: minute, Pre: premedication, An: Anesthesia, 0: baseline value, 0: Normal conscious position. All reflexes available, +: Partly response to needle prick stimuli and hardly responsive to environmental stimuli. Dilated pupilla, availability of palpebral and pedal reflexes responsive to eye and ear stimulus unable to stand up and tend to stay in lateral recumbency, ++: Limited palpebral and pedal reflexes, hardly has foot withdrawal response against needle prick, recumbent and unable to lift their heads (down), +++: No response to any pain reflexes, satisfactory muscle relaxation, deep general anaesthesia, no sign of reflexes.

responding normally on being approached and handled. Motor functions were tested as an apparent response to needle prick to legs and to various areas of abdominal area, a complete ability of hold its head in normal, resistance of the head and the neck by palpation against pulling and to attempt to from the table. Sensory functions were examined as response palpebral and corneal reflexes and as respond to sound.

The sedative and anesthetic effects of the drugs were assessed according to following criteria. Muscle relaxation was defined as the condition of no pedal reflex and head control.

Data were statistically evaluated by means of descriptive statistics and repeated measure ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons using MINITAB statistical program (Version 12.0 Minitab Inc., State College, PA, USA). Data are presented as *Mean ± Std.Error*. Measurements were compared with baseline values (time=0)

Results

The sedative and anaesthetic effects after drug administration are summarized in Table 1. The DBK drug combination used produced a satisfactory sedation and anaesthesia for the all sheep. The sedative effect of the DB appeared within 3 minutes and the anaesthetic effect started within 5 to 8 minutes after K administration as indicated by lack of pain stimuli and no reflexes. Profound anaesthesia was determined between 10 and 20 min after K administration but decreased at 30 min. All sheep recovered successfully.

The injection of AT effectively reversed the sedative effects of D, with the sheep regaining their feet after 4.8 min. All animals showed excitement after the injection of the antagonist, the animals being over-alert, nervous and exhibiting muscle tremor. No relapse into sedation was observed. The effect of AT on recovery was observed within 2 to 6 min (mean 4.8 min) after AT administration. There were full responses for motoric and sensoric functions at 10 min after AT injection.

Alterations in HR, RR and BT are summarized in Table 2. Mean heart rate decreased after premedication until the administration of AT ($P<0.05$), but increased following the AT injection. RR increased throughout the anaesthesia and after AT injection. There were no statistically differences seen between RR values during anaesthesia. Body temperature declined significantly ($P<0.05$) gradually throughout the anaesthesia from 39.5 to 38.7, which was still low 10 min after AT injection.

ECG values are summarized in Table 3. Amplitude of P values decreased at 30 minutes after K anaesthesia but returned its baseline value after 10 min of AT injection. PR value and R amplitude increased gradually during anaesthesia but decreased after the administration of AT. Q-T value gradually increased at 10 min after DB, at 10, 20 after K administration ($P<0.05$) and having the highest value at 30 minute of anaesthesia and, the increasing was significant after 10 min of AT injection. T amplitude increased significantly at 10 min after DB injection ($P<0.05$). But returned to approximate values of baseline during the anaesthesia.

Table 2. Mean heart and respiratory rates and body temperature (mean±SE) for fourteen sheep anaesthetized with detomidine (30 µg/kg) butorpanol (0.2 mg/kg) and ketamine (5 mg/kg) combinations and reversal by atipamezole (30µg/kg)

Parameters	Time (Min)	HR (beats/min)	RR (beats/min)	BT (C°)
Baseline value	0	94.11±2.13	39.78±2.79	39.53±0.09
Premedication	10	60.22±4.71*	50.67±7.18	39.29±0.09
Anaesthesia	10	64.44±4.24*	50.0±7.22	38.96±0.06*
	20	68.22±2.67*	42.89±4.51	38.91±0.16*
	30	66.00±2.0*	41.11±3.45	38.71±0.17*
Post-atipamezole	10	89.56±1.84	43.11±2.98	38.66±0.15*

*: Significantly (P<0.05) different

The blood gas and haemodynamic parameters are summarized in Table 4. pH value decreased slightly at 10 min after DB and K injection but was not significant. PCO₂ value increased significantly after DB and K injection during the anaesthesia but turned to decrease after AT administration. PO₂ value decreased

significantly during the anaesthesia but was increased at 10 min after AT injection. The values of HCO₃, CtCO₂ and PCO₂ increased significantly during anaesthesia and even after AT injection. There were no significant differences for Hg, WBC, RBC, PVC and Ht values compared to their baseline values

Table 3. Alterations in ecocardiographic parameters(mean±SE) for fourteen sheep anaesthetised with detomidine, butorpanol and ketamine combination and reversed by atipamezole injection

Parameters	Time (Min)	P-time	P ampli-tude	PR inter-val	QRS time	R ampli-tude	QT ampli-tude	T ampli-tude	ST time
Baseline value	0	0.03 ±0.004	0.04 ±0.006	0.08 ±0.004	0.04 ±0.00	0.16 ±0.030	0.22 ±0.005	0.20 ±0.058	0.18 ±0.010
Premedication	10	0.03 ±0.004	0.05 ±0.008	0.14 ±0.004*	0.06 ±0.004	0.24 ±0.007	0.26 ±0.005*	0.40 ±0.079	0.20 ±0.006
Anaesthesia	10	0.03 ±0.005	0.05 ±0.009	0.14 ±0.006*	0.05 ±0.006	0.24 ±0.007	0.26 ±0.005*	0.32 ±0.011	0.21 ±0.003
	20	0.03 ±0.005	0.03 ±0.004	0.14 ±0.007*	0.06 ±0.006*	0.26 ±0.015	0.28 ±0.008*	0.40 ±0.012	0.23 ±0.003*
	30	0.02 ±0.004	0.01 ±0.003*	0.13 ±0.001*	0.05 ±0.003	0.22 ±0.012	0.30 ±0.008*	0.26 ±0.037	0.27 ±0.003*
Post-At	10	0.03 ±0.004	0.04 ±0.01	0.12 ±0.005*	0.05 ±0.003	0.18 ±0.022	0.27 ±0.005*	0.22 ±0.072*	0.21 ±0.004

*: Significantly (P<0.05) different.

Table 4. Alterations in blood gas and heametalogic parameters (mean±SE) for fourteen sheep anaesthetised with detomidine, butorpanol and ketamine combination and reversed by atipamezole injection

Parameters	Time (Min)	pH	PCO ₂	PO ₂	HCO ₃ act	BE (ecf)	ctCO ₂	Hg	WBC	RBC	PCV
Baseline value	0	7.40 ±0.08	34.9 ±1.18	44.6 ±1.19	20.0 ±0.45	-4.31 ±0.31	20.9 ±0.54	9.4 ±0.12	7.67 ±0.81	11542 ±855.29	30.56 ±0.33
Premedication	10	7.39 ±0.08	39.5 ±1.05*	31.8 ±1.51*	22.4 ±0.34*	-1.88 ±0.31*	23.6 ±0.36*	8.3 ±0.16*	8.81 ±0.67	11133 ±138.69	31.33 ±0.37
Anaesthesia	10	7.36 ±0.07	42.6 ±1.32*	32.1 ±1.96*	22.9 ±0.58	-1.79 ±0.59	23.8 ±0.66	8.7 ±0.14*	12.51 ±0.29*	10611 ±139.63	30.89 ±0.92
	20	7.40 ±0.07	39.1 ±1.37	35.7 ±2.40*	23.3 ±0.70	-1.37 ±0.74	24.0 ±0.81	9.4 ±0.01	6.44 ±0.17	13011 ±484.50*	30.33 ±0.33
	30	7.40 ±0.01	40.3 ±0.93*	37.5 ±1.91	24.2 ±0.60*	0.58 ±0.85*	25.7 ±0.78*	9.5 ±0.10	10.83 ±0.91	12550 ±529.74*	30.33 ±0.33
Post-At	10	7.40 ±0.01	37.6 ±1.45	39.9 ±1.52	22.9 ±0.78*	-0.90 ±1.00	23.6 ±1.01	9.3 ±0.53	9.2 ±0.93	11991 ±996.02	30.22 ±0.22

*: Significantly (P<0.05) different

in spite of some degree of alterations between the anaesthesia intervals.

Discussion and Conclusion

After premedication partly reflex (+) in four sheep, limited reflex (++) in 10 sheep were recorded. At 10, 20 minutes of anaesthesia deep general anaesthesia was seen in all sheep. At 30 minute of anaesthesia partly reflex (+) in 10 sheep, limited reflex (++) in 4 sheep were recorded. From these, DBK anaesthetic combination can be used ideally in short-term anaesthesia for sheep. There was a smooth muscle tone for operative intervention (6,11,14).

A decrease in HR was recorded for all sheep during anaesthesia following administration of D which was significant at 10 min measurement. The bradycardic effects of alpha-2 agonist attributed to decreased sympathetic outflow from CNS, decreased catecholamine release in heart and increased vagal activity, which is a characteristic response to alpha-2 agonist (4,27). Decreasing in HR value consisted significantly after injection of K but was higher compared to the values determined at 10 min after premedication. Ketamine is a cardio stimulatory agent in sheep. This effect of K induces cardiovascular alteration by stimulating catecholamines due to depression of baroreceptors. After that catecholamines direct effects CNS (10). In this study D and K injection to sheep at a dose concentration of 30 µg/kg, 5 mg/kg resulted in a decreased HR value which was attributed to the depression effects on catecholamine releasing.

The tachycardia reported after K appears to be related to direct CNS stimulation causing a combination of sympathomimetic and parasympatholytic effect (24). In our study, there was no tachycardiac effect after K administration; this was attributed to the significant effect of D.

A mean of 1.6 °C decrease in body temperature was noted during the present study even after the decrease was significant at 10 min following AT injection. This is abolishing of body temperature during the general anaesthesia. Decreasing in body temperature should be taken into consideration particularly for the long duration of anaesthesia. Furthermore, heat loss may also be promoted by heat exchange with the environment. Khan et al. (14) compared to sedative and analgesic effects of xylazine and detomidine in small ruminants and found a decrease for HR and BT values during anaesthesia.

A significant increase in RR occurred immediately after D and K injection but started to decrease to the later stage of anaesthesia in the present study. It has been reported previously in the sheep that butorphanol alone does not produce significant cardiopulmonary effects at the dosage of 0.5 mg/kg (21).

Respiratory rate decreased when K was administered in sheep (25) but in our study RR increased unlike the quoted study. D induced hypoxemia and the resultant tachypnea in sheep has been well documented (8). It is believed that this is due to alpha-2 adrenoceptor mediated contraction of the airway or a reduction in pulmonary blood flow (16,20). However, absence of any change in RR after D, B and K administration at 10 min of anaesthesia suggests that D and B induced hypoxemia and subsequent tachypnea might have played a role in the increase in RR during DBK anaesthesia in our study. Moreover, a transient increase in respiratory rate was accompanied by a sustained increase in PCO₂. However, 10 min of anaesthesia PCO₂ decreased and PH and PO₂ values increased depending on RR. Interestingly, sheep anesthetized with DBK had a significantly lower PO₂ than sheep anesthetized with propofol (17). Several studies have indicated that hypoxemia is a characteristic response to the administration of an alpha-2 adrenoceptor mediated, because it could be prevented or reversed by alpha-2 antagonist.

There were no significant structural alterations in ECG parameters, but some parameters changed compared to baseline value. ECG parameters particularly returned to baseline values after AT administration. The alterations were particularly detected at P amplitude. Decreasing in P amplitude due to anaesthesia is an indicator of declining in atrial activation. Therefore, anaesthetic agents have effects on atrial stimulation. Transmission time in AV node increased due to anaesthesia but PR intervals extended, which might be commented a temporary 1. degree of AV bloc. Horse subjected to detomidine injection had II degree of AV block (5). Differences obtained from this study might be due to dose of drugs and different animal species. Increase in QRS time after 10 min and promotion in R amplitude after 20 min was considered to be due to a decrease in ventricular depolarization.

Recently the alpha-2 adrenoceptor antagonist (Atipamezole, yohimbine, talozoline) are widely used in veterinary practice. Atipamezole effectively antagonised the depressant effect of alpha-2 agonists (1,5,18). In this study following AT injection at 10 min HR and RR values significantly increased. A decrease in PCO₂ and increase in PO₂ values also supported the effect of AT. AT reduced the elimination half-life of D in sheep (6). Similar effect of AT have also been reported in dogs, 30 min after D resulting in an increased clearance of D (23). The effect of AT was rapid and persistent. No relapse into sedation was observed, in contrast to the resedation observed previously in reinder and dairy calves (8).

The blood gas analysis is the standart method for obtaining the alteration of blood values during anaesthesia (22). In the current study the significant alte-

rations were recorded for PCO₂, PO₂, HCO₃, BE (ecf) and CtCO₂ values during anaesthesia. The increase of PCO₂ attribute to decreasing in PH and BE (ecf) values. The decrease in BE (ecf) value indicates the accompanying of a mild metabolic acidosis (16). At the same time HCO₃, BE(ecf) and CtCO₂ values increased. PH value decreased at 10 min but there was no statistically difference recorded. The alteration of PCO₂ increased BE (ecf), HCO₃ and CtCO₂ values. Decreased cardiac output, hypotension and inadequate tissue perfusion caused by the cardiovascular depression may cause metabolic acidosis (2). The alteration in blood gas parameters, values of WBC, RBC, Hg, PVC and clinical findings related effects of anaesthetic agents. At the same time using of anaesthetic agents can cause respiratory acidosis (10). Therefore increase of PCO₂, decrease of PO₂ and pH values after premedication and 10 min of anaesthesia supported a mild metabolic acidosis in the present study.

The antagonistic effects of atipamezole on D induced sedation have been reported in sheep previously (11,14). In the present study, the sheeps were awake completely within three to five minutes without any side effects. The effect of AT observed in this study for heart rate was in accordance with those of the study reproted by Galatos (6).

In conclusion, DBK combination produced a profound sedation and anaesthesia in sheep. The combination appeared to be a reliable anaesthesia with no significant adverse side-effects.

References

- Atalan G, Uzun M, Demirkan I, Yıldız S, Cenesiz M. Effect of medetomidine-butorphanol-ketamine anaesthesia and atipamezole on heart and respiratory rate and cloacal tempature of domestic pigeons. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49(6): 281-5.
- Aantaa R. Alpha-2 adrenoceptor antagonists. *Baillieres Clin Anaesthesiol* 2000; 14: 285-92.
- Chittick E, Horne W, Wolfe B, Sladky K, Loomis M. Cadiopulmonary assessment of medetomidine, ketamine, and butorphanol anaesthesia in Captive Thomson's Gazelles (*Gazella Thomsoni*). *J Zoo Wildl Med* 2001; 32(2): 168-75.
- Dart CM. Advantages and disadvantage of using alpha-2 agonists in veterinary practice. *Aust Vet J* 1999; 77(11): 720-2.
- DiMaioKnych HK, Covamubias V, Steffey EP. Effect of yohimbine on detomidine induced changes in behavior, cardiac and blood parameters in the horse. *Vet Anaesth Analg* 2012; 39(6): 574-83.
- Galatos AD. Anaesthesia and analgesia in sheep and goats. *Vet Clin Food Anim* 2001; 27:47-59.
- Hall LW, Clerk KW. Anaesthesia in dog. Hall LW, Clerk KW eds. In: *Veterinary Anaesthesia*. Philadelphia: Bailliere Tindall,1991, pp. 51-347.
- Hall LW, Clerk KW, Trim CM. Anaesthesia of sheep, goats and other herbivores. Hall LW, Clerk KW, Trim CM eds. In: *Veterinary Anaesthesia*. England: W.B. Saunders, 2000, pp. 341-66.
- Hartsfield SM. Advantages and guidelines for using ketamine for induction of anaesthesia. *Vet Clin Small Anim* 1992; 22: 266-7.
- Howard BW, Lagutchik MS, Januszkiewicz AJ, Martin DG. The cardiovascular response of sheep to tiletamine-zolazepam and butorphanol tartrate anaesthesia. *Vet Surg* 1990; 19(6): 461-7.
- Kariman A, Sharifi D, Nowrouzian I. Evaluation of detomidine hydrochloride, diazepam and thiopental sodium combination on cardiovascular function and hemodynamics in sheep. *Small Rum Res* 1998; 29(1): 43-9.
- Kastner SBR. Alpha2 agonists in sheep: A review. *Vet Anaesth Analg* 1998; 33(2): 79-96.
- Kastner SBR, Ohlerth S, Pospischil A, Boller J, Huhtinen MK. Dexmedetomidine induced pulmonary alterations in sheep. *Res Vet Sci* 2007; 83 (2): 217-26.
- Khan MA, Ashraf M, Pervez K, Rashid HB, Mahmood AK, Chaudhry M. Comparative effects of detomidine and xylazine as sedative and analgesic agents in small ruminants. *Pak Vet J* 2004; 24 (2): 16-20.
- Laitinen OM. Clinical observation on medetomidine/ketamine anaesthesia in sheep and its reversal by atipemazole. *J Assoc Vet Anaest* 1990; 17: 17-19.
- Lin HC, Wallace SS, Tyler JW, Robbins RL, Thurmon JC, Wolfe DF. Comparasion of tilatamine-zolazepam-ketamine and tiletamine-zolezapam-ketamine-xylazine anaesthesia in sheep. *Aust Vet J* 1994; 71(8): 239-42.
- Lin HC, Prohit RC, Powe TA. Anaesthesia in sheep with propofol or with xylazine-ketamine followed by Halothane. *Vet Anaesth Analg* 1997; 26(3): 247-52.
- Mahmood BM, Mohammad FK. Antagonism of medetomidine sedation in goats by atipamezole and yohimbine. *Turk J Vet Anim Sci* 2008; 32: 429-32.

19. Mama KR. Anaesthetic management of Horse: Intravenous Anaesthesia. http://www.ivis.org/advances/Steffey_Anesthesia/mama_horse/chapter_frm.asp?LA=1, Access of date; 16.01.2009.
20. Nolan A, Livingston A, Waterman A. The effects of alpha-2 adrenoceptor agonists on airway pressure in anesthetized sheep. *J Vet Pharmacol Therap* 1986; 9: 157-63.
21. O'hair KC, Dodd KT, Philips YY, Beattie RJ. Cardiopulmonary effects of nalbuphine Hydrochloride and butorphanol tartrate in sheep. *Lab Anim Sci* 1988; 38(1): 58-61.
22. Onmaz AC, Gunes V, Atalan G, Gelfert CC, Atalan G. Comparasion of arterial and venous blood gas values in sheep before and during isoflurane anaesthesia. *Revue Med Vet* 2009; 160: 356-61.
23. Ranheim B, Arnemo JM, Stuen S, Horsberg TE. Medetomidine and atipamezole in sheep: Disposition and clinical effects. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23(6): 401-4.
24. Short CE. Effects of anticholinergic treatment on the cardiac and respiratory systems in dogs sedated with medetomidine. *Vet Rec* 1991; 129(14): 310-13.
25. Thurmon JC, Kumar A, Link EP. Evaluation of ketamine hydrochloride as an anaesthetic in sheep. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 162: 293-7.
26. Verstegen J, Petcho A. Medetomidine-butorphanol-midozalam for anaesthesia in dogs and its reversal by atipamezole. *Vet Rec* 1993; 132(14): 353-7.
27. Waterman AE, Nolan A, Livingston A. Influence of idazoxan on the respiratory blood gas changes induced by alpha2-adrenoceptor agonist drugs in conscious sheep. *Vet Rec* 1987; 121 (5): 105-7.
28. Waterman AE, Livingston A, Amin A. Analgesic activity and respiratory effects of butorphanol in sheep. *Res Vet Sci* 1991; 51(1): 19-23.



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

Araştırma Makalesi / Research Article
16(1), 8-15, 2019
DOI:10.32707/ercivet.538030

Kuluçka Sonrası İlk İki Haftada Lipopolisakkarit Uygulanan ve Uygulanmayan Broyleyler Civcivlerde Dalağın Histolojik Gelişimi*

Ebru AKA¹, Ülker EREN²

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

²Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Ülker EREN; E-mail: ueren@adu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-2451-8512

Atıf yapmak için: Aka E, Eren Ü. Kuluçka sonrası ilk iki haftada lipopolisakkarit uygulanan ve uygulanmayan broyleyler civcivlerde dalağın histolojik gelişimi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 8-15.

Özet: Civcivlerde aşılama, adaptif immunitenin geliştirilmesini amaçlar. Dalak, lenf düğümü olmayan tavuklarda, adaptif immunité açısından oldukça önemli role sahiptir. Sunulan çalışmada, broyleyler civcivlerde dalağın gelişiminin, antijenle uyarılmış ve uyarılmamış gruplarda araştırılması amaçlandı. Materyal olarak 225 adet Ross 308 ticari broyleyler civciv kullanıldı. Civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren beş ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde kontrol, lipopolisakkarit (LPS) ve PBS solusyonu uygulanan olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Antijenik uyarım LPS'nin intra-abdominal uygulaması ile gerçekleştirildi. Uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra üçer hayvandan dalak örneği alındı. Örnekler üçlü boyama, Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu ve orsein-Giemsma yöntemleriyle boyandı. Dalağın stroma ve parenşim kısımlarının gelişimi incelendi. Peri-ellipsoidal lenfoid doku (PEL) bölgelerinin, bir günlük civcivlerde gelişmemiş olduğu gözlemlendi. PEL'de dört günlük örneklerde tek tük lenfosit görülürken, ancak yedi günden itibaren lenfosit kümeleri ayırt edildi. Literatürden farklı olarak, subcapsular lenfoid doku (SCL) alanları tespit edildi. Periarteriolar lymphoid tissue (PAL), perivenous lenfoid doku (PVL) ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu görüldü. Germinal merkez (GC) yapısının bir günlükten itibaren taslak halinde olduğu, dördüncü günden itibaren retikulum iplikleri ile sınırlandırıldığı ve iki haftanın sonunda gelişimini tamamladığı belirlendi. GC'nin de dalağın beyaz pulpasına ait sabit bir yapı olduğu düşünüldü. Granulopoezis en yoğun olarak bir günlük civcivlerde belirlendi. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan örneklerde, beyaz ve kırmızı pulpa açısından histolojik bir farklılık gözlemlenmedi. Araştırma sonunda, broyleyler dalağında adaptif immunité görev alan kısımların, iki haftadan önce histolojik gelişimini tamamlamamış olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Broyleyler civciv, dalak gelişimi, kuluçka sonrası

The Histological Development of the Spleen in Broiler Chicks Treated with and without Lipopolysaccharide in the First Two Weeks of the Post-Hatch Period

Summary: The vaccination procedure for chicks aims to develop adaptive immunity. The spleen has an important role in adaptive immunity in chickens without lymph nodes. It was aimed to investigate the development of spleen tissue in broiler chicks in antigen-stimulated and non-stimulated groups. A total of 225 Ross-308 commercial broiler chicks were used. The chicks were divided into five main groups (age: 1, 4, 7, 10 and 14 days), each containing 45 chicks. Each group was divided into three subgroups which included control, phosphate buffered saline (PBS) and lipopolysaccharide (LPS)-injected. Antigenic stimulation was carried out through the intra-abdominal administration of LPS. Spleen samples were collected separately at 1, 3, 6, 12, and 24h after injections. Tissue sections were stained using triple staining, Gordon and Sweet's silver staining and orsein-Giemsma methods. The development of the stroma and parenchyma of the spleen was studied. It was seen that the peri-ellipsoidal lymphoid tissue (PEL) regions were not developed in one-day-old chicks. In PEL, only a few lymphocytes were observed in four-day-old samples, but lymphocyte clusters were distinguished in seven days old samples. Subcapsular lymphoid tissue (SCL) focuses were detected, unlike those found in the literature. Periarteriolar lymphoid tissue (PAL), perivenous lymphoid tissue (PVL) and SCL had more lymphocyte than PEL. The germinal center (GC) was found to be in draft form beginning from the first day, to be restricted by reticular fibers from the fourth day, and to be completed at the end of two weeks. GC was also thought to be a constant structure of white pulp of the spleen. Granulopoiesis was found most severe in one-day-old chicks. No histological difference was observed between the white and red pulp areas with and without antigenic stimulation. At the end of the research, it was seen that the parts involved in adaptive immunization sites did not complete histological maturation in the spleen of broiler chicks before the age of two weeks.

Key words: Broiler chick, post-hatch, spleen development

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.03.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.05.2018

*İlk isim yazarın, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, VTF-14020 numaralı proje ile desteklenmiş olan Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından hazırlanmıştır.

Giriş

Kanatlı türlerinin bir çoğunda lenf düğümü bulunmadığından dalak sekonder lenfoid organ olarak önemli bir yere sahiptir. Dalak, kuluçka döneminde lenfoid ve

non-lenfoid hücreler arasındaki etkileşim için vazgeçilmez bir mikroçevre sağlayan sekonder lenfoid organ olarak gelişmeye başlar (31). Kuluçkadan sonraki ilk altı hafta boyunca hızlı bir şekilde büyür ve 10. haftada maksimum büyüklüğe ulaşır (18,28).

Dalak parenşimi, beyaz pulpa ve kırmızı pulpadan oluşmaktadır (9). Dalak, kanatlılarda histolojik yapı bakımından memelilerden farklı özelliklere sahiptir. Kollagen ve retiküler iplik içeren ince bir kapsüle sahip olan kanatlı dalağında (28) belirgin trabekül yapısı gözlenmezken (1,9), kırmızı pulpa oranı daha azdır (14), marjinal zone bulunmaz (25) ve kapalı dolaşıma sahiptir (23). Ayrıca lenfoid dokuda bulunan GC kapsülle sarılı olup (28), koyu ve açık bölgeler içermez (34). Kanatlılarda dalak arterinin kolları, bağdokusu çok az olan trabeküllerde ilerler ve pulpaya girince sentral arter olarak devam eder. Sentral arter, ince kas tabakası olan arteriyollere ayrılır, daha sonra arteriyoller kas tabakası bulunmayan penisillar kapillarlar olarak dallanırlar. Penisillar kapillarlar venöz sinüslerle bağlantı halindedir. Venöz sinüsler toplayıcı venlere açılır, devamında trabeküler venler oluşur ve venöz kan dalaktan ayrılır (28).

Tavuk dalağında beyaz pulpa, arteriyol çevresi lenfoid doku (periarterioler lymphoid tissue/PAL veya peri-arteriyolar lymphoid sheath/ PALS), vena çevresi lenfoid doku (perivenous lymphoid tissue /PVL), elipsoid çevresi lenfoid doku (perielipsoidal lymphoid tissue/PEL veya PELT) ve germinal merkez (germinal center /GC) olmak üzere dört farklı kısım tarafından oluşturulur (24).

PAL, sentral arter çevresinde bulunur ve T lenfositlerden oluşan yoğun bir katman ile az sayıda B lenfositlerden oluşmuştur (22,23,28). PAL'da interdijital dendritik hücreler (interdijital dendritic cells/IDC) T hücreleri arasında dağılmışlardır ve KUL-01⁺ MHC II⁺, CD57⁺dirler (19).

Penisillar kapillarlar elipsoid yapısına katılırlar. Elipsoid, endotel hücreleri kalın bir bazal membran üzerine oturmuş halde bulunan penisillar kapillarlar birlikte çevresindeki retikulum hücrelerinin yani elipsoid ilişkili hücrelerin (elipsoid associated cells /EAC) oluşturduğu yapı olarak tanımlanmaktadır (8,11,26). Elipsoid ilk kez kanatlı dalağında Billroth tarafından keşfedilmiş ve Schweigger-Seidel, bu kısmın filtre aparatı olduğundan bahsetmiştir (8). Olah ve ark. (26) elipsoid yerine Schweigger-Seidel Sheath tanımlamasının daha doğru olacağını ileri sürmektedirler. Elipsoidin hücreleri, dış taraftan kesintili bir kapsülle çevrelenmiştir, bu kısımda bağdoku elemanlarının bulunduğu gözlenmiş ve bu kısma Schweigger-Seidel kapsülü (Capsule of Schweigger-Seidel/ CSS) adı verilmiştir (8,23). PEL, elipsoid çevresi beyaz pulpa (perielipsoidal white pulp/PWP) olarak da tanımlanmaktadır (25,28). PEL, B lenfositlerden oluşan yoğun bir katmandan oluşur (20,22). PEL'in etrafında makrofaj

halkası bulunur (12,19). Elipsoid ilişkili makrofajlar T bağımlı bölgelere göç ederek, antijenleri T lenfositlere sunarlar (13).

Tavuk dalağında GC'lerin pulpa arterinin yakınında, PAL'ın başladığı yerde, pulpa arteri ile penisillar arteriyol arasında, arterlerin çatallanma kısmında yerleştiği bildirilmiştir (7,28). Ogata ve ark. (24) ise PVL'de GC'ye rastladıklarını bildirmişlerdir. Tavuklarda PEL, GC ve plazma hücre hattındaki hücreler, bursa Fabricius (BF) bağımlı bölgelerdir (8,10,12,22). PEL ve GC'de az miktarda T lenfosit bulunduğu da kaydedilmiştir (10). Kırmızı pulpada hem lenfoid hem de non-lenfoid hücreler bulunur (27). Sinüslerde T hücreleri daha baskındır (33).

Tavuklarda adaptif immunité için, sekonder lenfoid doku olarak sindirim sisteminde bulunan GALT (gut associated lymphoid tissue), organ olarak da dalak görev alır. Tavuklarda lenf düğümü olmadığından dalak, immunitenin sağlanmasında önemli bir yer tutmaktadır. Civcivler, immun yeterliliklerini kuluçkadan sonraki dönemde kazanırlar (5). Civcivlerde immun mekanizmaların gelişiminin kontrolü ve güçlendirilmesi amacıyla besleme çalışmaları veya antijen uygulamaları gibi denemeler yapılmaktadır (2,16,30). Civcivlere yapılan aşılama ise doğrudan adaptif immunitenin oluşumunu hedeflemektedir. Dolayısıyla aşılamalara verilen yanıt da immun sistemin gelişimi ile doğru orantılı olmaktadır (20).

Broyerlerin ticari nedenlerle ömrü kısa olduğundan savunma mekanizmalarının gelişimi önemli bir konu oluşturmaktadır. Sunulan çalışmada broyler civcivlerde, kuluçkadan sonraki ilk iki haftalık dönemde, antijenik uyarımla yapılan ve yapılmayan gruplarda dalağın histolojik gelişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırmada materyal olarak toplam 225 adet Ross 308 ticari etlik civciv kullanıldı. Ticari bir işletmeden (Egetav), kuluçkadan yeni çıkmış ve aşılanmamış olarak sağlanan civcivler; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde, izole bir ortamda barındırıldı. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Bütün prosedür etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi (Etik Kurul Onay Karar No: 2010/106)

İki haftalık süreçte civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren beş ana gruba ayrıldı. Her grup on beşer hayvan içeren üç alt gruba ayrıldı. Bir alt gruba, dalağın gelişiminde farklılık oluşturabileceği düşünülerek LPS (lipopolisakkarit) uygulandı. Bakteriyel LPS'nin (Purifiye *E.coli* 011:B4 lipopolisakkaridi) fosfat tampon solüsyonu (Phosphat Buffer Saline/PBS)'de hazırlanmış solüsyonu intra abdominal yolla, 1mg/kg dozda (17,29), bir kez enjekte edildi. İkinci alt gruba (çözgen grubu) aynı miktarda PBS intra abdominal olarak enjekte edildi. Üçüncü alt gruba (kontrol) ise herhangi bir uygulama yapılmadı.

LPS ve PBS uygulanan alt gruplardan, uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra üçer hayvandan dalak örnekleri alındı. Aynı saatlerde, kontrol alt grubundan da üçer hayvandan doku örneği alındı.

Dokuların hazırlanması ve boyama metotları

Hayvanlar belirtilen zamanlarda dekapitasyon yöntemi ile öldürülerek dalakları çıkarıldı ve 18-24 saat % 10'luk tamponlu nötral formalinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin doku takip işleminden sonra parafinde bloklandılar. Parafin bloklardan 60 µm arayla 6 µm kalınlığında seri kesit alındı. Parafin kesitlere, genel dalak histolojisinin incelenmesi amacıyla üçlü boyama yöntemi (3), retikulum ipliklerinin belirlenmesi için Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu (6), elastik iplikler için orcein-Giemsma boyama metodu (4) uygulandı.

Doku kesitlerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Leica DMLB) incelendi. Görüntüler video kamera (Leica DC200) ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Araştırma mikroskobu ve görüntü analiz programı (Lecia Q win standart) kullanılarak, her grubun üçüncü saat örneklerinde, 20'lik objektifte, 0,145 mm²lik alanda görülen granülopoezis oranı belirlendi. Bu amaçla, kapsül altından başladıktan sonra bir görüntü alanı arayla, her kesitte toplam beş görüntü alanında ölçüm yapıldı. İnteraktif olarak granülopoetik hücrelerin bulunduğu bölgeler sınırlandırıldı ve kapladıkları alan ölçüldü. Her hayvandan üç adet kesitte toplamda 15 görüntü alanında granülopoetik hücrelerin kapladığı alan belirlendi. Daha sonra 1, 4 ve 7 günlük civcivlerde 0,145 mm²de kaydedilen veriler 1 mm² alanda olacak şekilde dönüştürülerek istatistiki incelemesi yapıldı. On ve 14 günlük örneklerde granülopoezis görülmediği için değerlendirme yapılmadı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Version 11,5) paket programı kullanıldı. Granülopoezis için, aynı gün içinde gruplar arası farklılıklar ve aynı grup içinde günler arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile farkların önem kontrolü ise Duncan testi ile yapıldı (32).

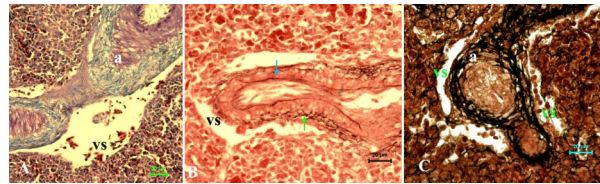
Bulgular

Broyler civcivlerde ilk iki haftalık dönemde LPS uygulanan, sham kontrol ve kontrol gruplarında dalağın histolojik yapısı stroma ve parenşim açısından incelendi.

Bütün gruplara ait örneklerde, bir günlükten on dört günlüğe doğru fibröz bağdokudan oluşan kapsülün kalınlığının arttığı gözlemlendi. Kapsülde kollagen ipliklerinin yanında, elastik iplik ve retikulum iplikleri de tespit edildi. Elastik iplik yoğunluğunun gittikçe arttığı dikkati çekti. Retikulum ipliklerinin oranının değişmediği gözlemlendi. Kapsülün parenşime yakın kısımlarında daha

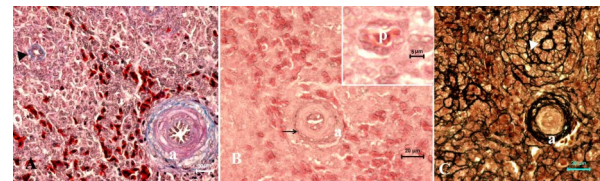
yoğun olmak üzere düz kas hücrelerine rastlandı, ilerleyen günlerde sayılarının arttığı gözlemlendi. Kapsülde arter, vena ve çok sayıda lenf kapilları belirlendi. Organ kapsülünden parenşime doğru düzenli bir trabekül girişine rastlanmadı. Parenşimde trabeküler bağ dokuya, özellikle arterlerin etrafında daha belirgin olarak rastlandı.

Trabeküllerde ve parenşimde bulunan arter ve arteriyol duvarları incelendi. Orta çaplı arterlerin duvarında elastik ipliklerinin oluşturduğu laminalar yanında, retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 1).



Şekil 1. Trabeküler arterin görünümü (A) ve duvarında elastik iplik (B) ve retikulum ipliklerinin (C) organizasyonu. a: Arter, vs: venöz sinus, lamina elastika interna (mavi ok) ve lamina elastika eksterna (yeşil ok). Sırasıyla üçlü boyama, orcein-Giemsma ve Gordon ve Sweet'in gümüşleme metotları

Bir günlük örneklerden itibaren dalak kesitlerinde arteriyollerin duvarında bir miktar düz kas hücrelerinin bulunduğu görüldü. Arteriyollerin dallanarak penisilar kapilları (elipsoid kapillar) oluşturdukları gözlemlendi. Elipsoid kapillarların duvarında düz kas hücrelerinin kalmadığı fakat çok az miktarda bağ doku elemanının varlığı dikkati çekti (Şekil 2A). Arteriyollerin yapısında az miktarda elastik iplik, daha çok oranda retikulum ipliği bulunduğu gözlemlendi (Şekil 2B, C). Penisilar kapillarların etrafında elastik iplik bulunmazken (Şekil 2B) retikulum ipliklerinin varlığını sürdürdüğü dikkati çekti (Şekil 2C).

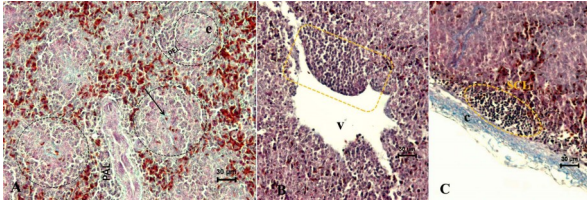


Şekil 2. A: Parenşimde arteriyol (a) ve penisilar kapilların görünümü (ok başı). Üçlü boyama. **B:** Arteriyol duvarında elastik iplik görünümü (ok) ve penisilar kapillar (p). Orcein-Giemsma Boyama Yöntemi. **C:** Arteriyol duvarında retikulum ipliklerinin görünümü (a) penisilar kapillar (ok başı). Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

Histolojik kesitlerde venöz sinüsler, pulpa venleri ve vena trabekularisler ayırt edildi. Venöz sinüs görüntülerine kırmızı pulpa kısımlarında, trabeküler arterlerin yakınılarında ve kapsül altında rastlandı. Bir günlükten itibaren, kapsül altında venöz sinüslerin varlığı dikkati çekti. Venöz sinüslerin duvarında az miktarda retiku-

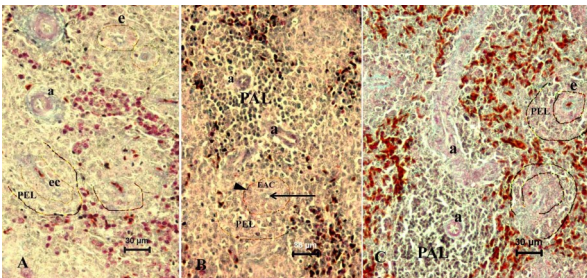
lum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı. Dalak parenşiminde ve trabeküllerde bulunan venalarda az miktarda da olsa elastik iplik görüldü. Retikulum ipliklerinin elastik ipliklere göre daha yoğun olduğu dikkati çekti.

Dalağın beyaz pulpa kısmında PAL, PEL (Şekil 3A), PVL (Şekil 3B) ve GC'nin yanında, kapsülün altında yerleşmiş olan lenfoid doku alanları da (Sub-kapsular lenfoid doku / SCL) (Şekil 3C) gözlemlendi. Beyaz pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelendi. PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren görülmeye başlandı. Her üç kısım da başlangıçta taslak halinde görülürken, günler ilerledikçe hücre yoğunluğunun arttığı fark edildi.



Şekil 3. Beyaz pulpayı oluşturan kısımların görünümü. Üçlü boyama. **A.** On dört günlük örnekte arteriyol çevresinde lenfoid doku (PAL) ve elipsoid (e) çevresi lenfoid dokunun (PEL) görünümü. Ok: Elipsoid kapilllar. **B.** Dört günlük örnekte vena çevresinde lenfoid dokunun (PVL) görünümü (kesik çizgiyle sınırlanmış alan), vena (v). **C.** On dört günlük örnekte kapsülaltı lenfoid dokunun (SCL) görünümü (kesik çizgiyle sınırlanmış alan), kapsül (c)

Elipsoid kapilllar ile çevrelerindeki EAC'lerin birlikte oluşturdukları ellipsoidler görüldü. Başlangıçta PEL'deki hücrelerin sitoplazmalarının açık renkte ve çekirdeklerinin ökratik olduğu, hücre sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi (Şekil 4A). Dördüncü günden itibaren retikulum hücreleri arasında lenfositler ayrıldı (Şekil 4B).

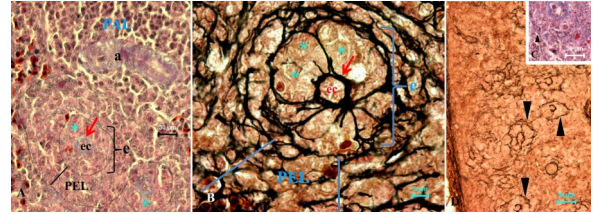


Şekil 4. Elipsoid çevresi lenfoid dokuyu (PEL) oluşturan hücrelerin görünümü. Üçlü boyama. **A.** Bir günlük örnekte PEL hücreleri. a: Arteriyol, ec: elipsoid kapilllar, e: elipsoid. **B.** Dört günlük örnekte PEL hücreleri. a: Arteriyol, PAL: arteriyol çevresi lenfoid doku, ok başı: elipsoid, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, ok: elipsoid kapilllar. **C.** On dört günlük örnekte PAL ve PEL'in görünümü. a: arteriyol, e: elipsoid

Yedinci günden itibaren PEL bölgesindeki hücrelerin daha belirgin oldukları, lenfositlerin kümelendiği dikkati çekti. Bununla birlikte on dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi (Şekil 3A, 4C). PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içeriklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti. PAL, PEL, SCL ve PVL kısımları açısından, antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan gruplar arasında fark gözlemlendi.

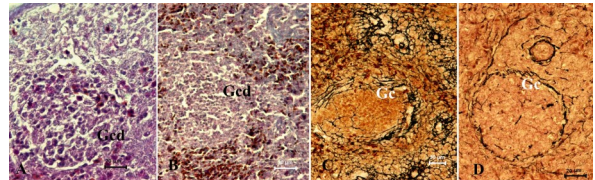
Elipsoid kapilllarını çevreleyen bağdokunun belirgin olduğu (Şekil 5A), kapilları çevreleyen EAC'lerin aralarında retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi (Şekil 5B). Ayrıca EAC'nin dış kısmında yer alan (Şekil 5C) ve kapilllar endotele doğru ince kollar gönderen Schweigger-Seidel kapsülünün oluşumuna retikulum ipliklerinin katkı verdiği görüldü (Şekil 5C, D).

Kapsülsüz olan GC taslakları birinci günden itibaren görülsede retikulum ipliklerinin dört günlükten sonraki örneklerde GC'yi sınırlayan kapsülü oluşturmaya başladığı dikkati çekti. Yedi günden itibaren GC etrafında retikulum ipliklerinin net olarak ayrıldı



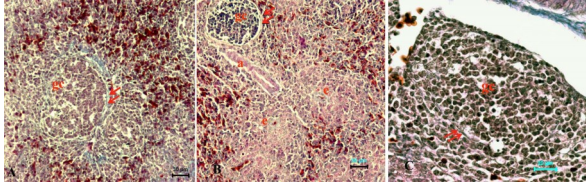
Şekil 5.A. Elipsoid (e) ve elipsoid kapilları çevreleyen bağ dokunun görünümü (ok). ec: Elipsoid kapilllar, *: elipsoid ilişkili hücreler, e: elipsoid, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku, a: arteriyol, PAL: arteriyol çevresi lenfoid doku. Üçlü boyama. **B.** Elipsoid (e) ve çevresinde retiküler ipliklerin görünümü. ec: Elipsoid kapilllar, ok: elipsoid kapilllar çevresinde retikulum ipliği, *: elipsoid ilişkili hücreler, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu. **C.** Schweigger-Seidel kapsülünün (CSS) görünümü (ok başı) Üçlü boyama. **D.** CSS'de retikulum ipliklerinin görünümü (ok başları). Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

görüldü. Devamında on ve on dört günlük civcivlerin dalağında GC'lerin bağ dokudan bir kapsülle çevrelenmiş olduğu ve bu kapsülün retikulum ipliklerini içerdiği (Şekil 6) gözlemlendi.



Şekil 6. Germinal merkezin görünümü. **A-B:** Sırasıyla bir ve dört günlük örneklerde germinal merkez taslağının (Gcd) görünümü. Üçlü boyama. **C-D:** Sırasıyla yedi ve on dört günlük örneklerde germinal merkez (Gc) çevresinde retikulum ipliklerinin görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

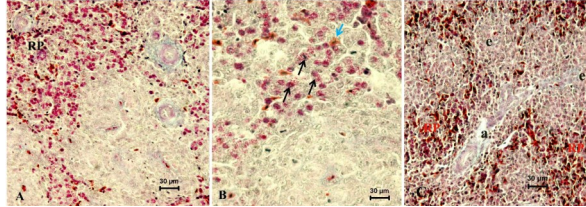
Kapsülle çevrelenmiş GC'ye parenşimin herhangi bir yerinde, arteriyol yakınında, kapsüle yakın veya PVL içinde rastlandı (Şekil 7).



Şekil 7. On dört günlük örneklerde parenşimde (A), arteriyol yakınında (B), ve PVL içinde (C) germinal merkezin görünümü. Gc: Germinal merkez, a: arteriyol, e: elipsoid kapillar, çift ok: germinal merkezin kapsülü. Üçlü boyama

GC'in on dört günlük örneklerde en net haliyle görülebildiği dikkati çekti. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan gruplar arasında GC açısından farklılık gözlenmedi.

Beyaz pulpa ve trabeküller dışında kalan kısım olan venöz sinuslar ve kırmızı pulpa alanları, kırmızı pulpa olarak değerlendirildi. Venöz sinuslara kapsül altında, trabeküler arterlerin çevresinde, parenşimde rastlandı. Kontrol, PBS ve LPS grupları arasında kırmızı pulpa açısından, histolojik herhangi bir farklılık dikkat çekmedi.



Şekil 8. Bir ve on dört günlük örneklerde kırmızı pulpanın görünümü. Üçlü boyama. A. Bir günlük kontrol grubunda 1. saat örneklerinde kırmızı pulpada (RP) granuler hücreler, B. Granülositler (siyah oklar) ve eritrositlerin (mavi ok) görünümü. C. On dört günlük PBS grubunda kırmızı pulpada (RP) eritrositlerin görünümü. a: Arteriyol, e: elipsoid kapillar

Kırmızı pulpa alanlarında, birinci günde en yoğun olmak üzere, granülopoezis gözlemlendi (Şekil 8A, B). Granülopoetik hücreler gittikçe azalarak on günlükten itibaren yerlerini eritrositlere bıraktılar (Şekil 8C).

Granülopoezisin yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildi. Aynı grup içerisinde günler arası farklara bakıldığında, granülopoezisin yoğunluğunun her üç alt gruba ait, bir günlük örneklerde en fazla olduğu görüldü ($P<0.001$) (Tablo 1).

Granülopoezisin yoğunluğunda dört ve yedinci günlerde büyük bir azalma belirlendi. On günlük örneklerde tek tük rastlanan granülopoetik topluluklar on dördüncü günde gözlenmedi. Bir ve yedinci günlerde uygulama grupları arasındaki granülosit yoğunluğu değerlerinde dalgalanmalar olduğu ve bunun anlamlı olmadığı tespit edildi. Dördüncü günde PBS grubunda granülositlerin daha az olduğu ($P<0.001$) görüldü.

Tartışma

Sunulan çalışmada, broyler civcivlerin kuluçka sonrası iki haftalık döneminde dalağın histolojik gelişimi incelendi. Dalak kapsülünün içeriği ile ilgili elde edilen bulgular araştırmacıların (1,9,15,18) bildirdikleriyle uyumludur. Bunun yanında; yapılan çalışmada parenşime yakın kısımda daha yoğun olan düz kas hücrelerinin, ilerleyen günlerde sayılarının arttığı gözlenmiştir. Kollagen ipliklerin yanında elastik ipliklerin yoğunluğunun da giderek arttığı fakat retikulum ipliklerinin miktarının değişmediği dikkati çekmiştir.

Araştırmacıların (14,28) bildirdiği şekilde sentral arter, sentral arteriyol ve penisilar kapillarlar ayırt edildi. Duvarlarında elastik iplik, retikulum ipliği ve düz kas hücrelerinin organizasyonları kaydedildi. Broyler civcivlerde (1) ve bildiricilerde (18) sentral arter, arteriyol ve penisilar kapillar duvarında retikulum ipliklerinin varlığı bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada, venöz sinusların duvarında az miktarda retikulum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı. Venalarda az miktarda elastik

Tablo 1. Civcivlerin dalağında birim alanda (1 mm^2) granülopoezis yoğunluğu (mm^2)

	1 gün ($X \pm S_x$)	4 gün ($X \pm S_x$)	7 gün ($X \pm S_x$)	P
Kontrol	0.279 ^a ±0.015 (n=40)	0.042 ^{b,A} ±0.003 (n=45)	0.007 ^c ±0.001 (n=45)	0.000 ***
PBS	0.268 ^a ±0.017 (n=40)	0.021 ^{b,B} ±0.001 (n=45)	0.013 ^b ±0.002 (n=45)	0.000 ***
LPS	0.244 ^a ±0.013 (n=45)	0.054 ^{b,A} ±0.007 (n=45)	0.013 ^c ±0.002 (n=45)	0.000 ***
P	0.232 ÖD	0.000 ***	0.073 ÖD	

^{a, b, c}: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ($P<0.05$);

^{A, B}: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ($P<0.05$);

ÖD: Önemli değil, ***: $P<0.001$

iplik, daha fazla miktarda olmak üzere retikulum ipliklerinin olduğu dikkati çekti. Dalakta venöz sinuslar ve venaların duvarında bulunan bağdokusu iplikleri ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Ogata ve ark. (24) tavuk dalağında beyaz pulpanın; PAL, PVL, PEL ve GC olmak üzere dört farklı kısımdan oluştuğunu bildirmişlerdir. Belirtilen beyaz pulpa kısımlarına ilaveten sunulan araştırmada SCL tanımlandı ve farklı günlerde alınan doku örneklerinde pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelendi. Yapılan literatür taramasında dalakta SCL tanımlanmasına rastlanamadı.

Ogata ve ark. (24) PAL oluşumunu iki günlükken bir adet civcivde (White Leghorn Babcock B 300), dört günlükten itibaren bütün civcivlerde gözlemişlerdir. Kuluçkadan çıktığı gün bir civcivde lenfosit birikimi olarak PVL gördüklerini, iki günden sonra bütün civcivlerde PVL'nin bulunduğu dikkat çekmişlerdir. Sunulan çalışmada ise PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren bütün kesitlerde görülme-ye başlamıştır.

Yapılan araştırmada elipsoid ve kapsül (CSS) incelendi. Penisillar kapillerleri oluşturan endotelin ve EAC'in etrafında retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu görüldü. Ayrıca Schweigger-Seidel kapsülünün oluşumuna retikulum ipliklerinin katkı verdiği ayırt edildi. Elde edilen bulgular, araştırmacıların (23,25,26) bulguları ile uyumludur. Gumati ve ark. (8) beç tavuğunda yaptıkları çalışmada ise penisillar endotel çevresinde ve PWP'de kollagen tip III'ün (retikulum ipliğinin) bulunmadığını fakat PAL'da görüldüğünü bildirmişlerdir.

Araştırmacıların (18,22) bildirdiği şekilde, elipsoid çevresindeki PEL hücrelerinin sitoplazmalarının açık renkte ve çekirdeklerinin ökromatik olduğu, hücre sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi. Ogata ve ark. (24) PEL'in lenfosit birikimleri halinde ilk kez altıncı günde görüldüğünü, ikinci haftadan sonra PEL'de bulunan lenfositlerde artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mishra ve ark. (21) da gelişimin onuncu gününde beyaz pulpa ve kırmızı pulpanın düzenlenmesinin daha da belirginleştiğini bildirmişlerdir. Mori ve Hoshi (22) iki haftanın sonunda perielipsoidal lenfoid dokunun tanımlanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan araştırmada dördüncü günden itibaren retikulum hücreleri arasında lenfositler ayırt edildi. Yedinci günden itibaren PEL bölgesindeki hücrelerin daha belirgin oldukları, lenfositlerin kümelenildiği dikkati çekti. Bununla birlikte on dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi. PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti.

Tavuklarda lenfoid dokuda bulunan GC'nin kapsülle sarılı olup (28), koyu ve açık bölgeler içermediği bildirilmiştir (34). Sunulan çalışmada, GC'ler kapsülsüz

olarak taslak halinde bütün gruplarda birinci günden itibaren görülebilirken, etrafındaki retikulum iplikleri dört günlükten sonraki örneklerde görülmeye başlamıştır. Yedi günden itibaren retikulum ipliklerinin net olarak ayırt edilirken, on ve on dört günlük civcivlerde GC'lerin belirgin bir kapsülle çevrelediği dikkati çekmiştir. Yerleşim olarak GC'ye araştırmacıların (7,24,28) bildirdiği şekilde parenşim dokusunun farklı yerlerinde rastlanmıştır. Sunulan çalışmada GC on dört günlük örneklerde en net haliyle görülebilmektedir. Nitekim adaptive immunité ile ilgili olarak Mast ve Goddeers (20) broyler civcivlerde antikor oluşturabilecek şekilde immün yeterliliğin, kuluçka sonrası dönemde 12. günden itibaren oluştuğunu bildirmişlerdir.

Olah ve Vervelde (28) kuşlarda kuluçkadan çıktıktan hemen sonraki 24 saat içerisinde lenfosit ve monosit gelişimini takiben dalakta heterofillerin uzaklaştığını, kuluçka sonrası 48 saat içerisinde lenfositlerin organın dominant hücreleri haline geldiğini belirtmiştir. Sunulan çalışmada ise granülopoezisin yoğunluğunun, her üç alt gruba ait bir günlük örneklerde, en fazla olduğu görüldü ($P<0.001$). Granülopoezisin yoğunluğunda dört ve yedinci günlerde büyük bir azalma belirlendi. Dördüncü günde PBS grubunda granülositlerin daha az olmasının ($P<0.001$), bulaşma olması durumunda granülositleri artırması beklendiğinden, bireysel farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. On günlük örneklerde tek tük rastlanan granülopoetik topluluklar on dördüncü günde gözlenmedi. Alt gruplar arası değerler incelendiğinde antijenik uyarımın granülopoezisi etkilemediği dikkati çekti. Bildiricilerde ise bir-iki günlük örneklerde granülosit adacıklarının kaybolduğu bildirilmiştir (18).

Sonuç olarak, literatürden farklı olmak üzere SCL kısmı tanımlandı. Dalağın, özellikle B lenfositlerin yoğun olduğu PEL bölgelerinin, bir günlük civcivlerde gelişmemiş olduğu gözlemlendi. Dördüncü günde tek tük lenfosit görülürken, ancak yedi günlüklerden itibaren bu bölgelerde lenfosit kümeleri ayırt edildi. On dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi. PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti. GC yapısının bir günlükten itibaren taslak halinde var olduğu, iki haftanın sonunda gelişimini tamamladığı belirlendi. GC'nin PAL ve PEL, PVL ve SCL gibi dalağın beyaz pulpasına ait sabit bir yapı olduğu düşünüldü. Granülopoezis en yoğun olarak bir günlük civcivlerde belirlendi. Onuncu günden itibaren granülopoezis görülmedi. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan kısımlar arasında beyaz ve kırmızı pulpa açısından histolojik bir farklılık gözlenmedi. Çalışma sonunda, broyler dalağında adaptif immunité görev yapacak kısımların iki haftadan önce histolojik gelişimini tamamlamadığı tespit edildi.

Kaynaklar

1. Akter S, Khan MZI, Jahan MR, Karim MR, Islam MR. Histomorphological study of the lymphoid tissues of broiler chickens. *Bangl J Vet Med* 2006; 4(2): 87-92.
2. Barr Shira E, Sklan D, Friedman A. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105(1): 33-45.
3. Crossmon GA. Modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69(1): 33-8.
4. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology and Technique*. Fourth Edition. London: Butterworths, 1985; p: 176.
5. Erf GF, Bottje WG, Bersi TK. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathology* 1998; 62(4): 339-48.
6. Gordon, H and Sweet, HH. A simple method for the silver impregnation of reticulin. *Am J Pathol* 1936; 12(4): 545.
7. Graczyk S, Kuryszko J, Madej J. Reactivity of spleen germinal centres in immunized and ACTH-treated chickens. *Acta Vet Brno* 2003; 72(4): 523-31.
8. Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz E, Felföldi B, Olah I. Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Tissue Res* 2003; 312(3): 333-43.
9. Hodges RD. *The Histology of The Fowl*. London: Academic Press, 1974; pp. 221-5.
10. Hoffmann-Fezer G, Rodt H, Götze D, Thierfelder S. Anatomical distribution of T and B lymphocytes identified by immunohistochemistry in the chicken spleen. *Int Arch Allergy Immunol* 1977; 55(1-6): 86-95.
11. Igyarto BZ, Magyar A, Olah I. Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res* 2007; 327(1): 83-92.
12. Jeurissen SHM, Claassen E, Janse EM. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 1992; 77(1): 75-80.
13. Jeurissen SHM. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen specific humoral response. *Immunology* 1993; 80(1): 29-33.
14. John JL. The avian spleen: a neglected organ. *Q Rev Biol* 1994; 69(3): 327-51.
15. Kannan TA, Ramesh G, Ushakumari S, Dhinakaraj G, Vairamuthu S. Electron microscopic studies of spleen in chicken (*Gallus domesticus*). *IJAVST* 2015; 4(1): 160-5.
16. Klasing KC. Nutrition and the immune system. *Br Poult Sci* 2007; 48(5): 525-37.
17. Koutsos EA, Klasing KC. The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp Biochem Physiol Part C* 2001; 128(2): 255-63.
18. Liman N, Bayram GK. Structure of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) spleen during pre-and post-hatching periods. *Rev Med Vet* 2011; 162(1): 25-33.
19. Mast J, Goddeeris BM. CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken. *Cell Tissue Res* 1998; 291(1): 107-15.
20. Mast J, Goddeeris BM. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70(3): 245-56.
21. Mishra UK, Singh GK, Chauhan RS. Histomorphological development of lymphoid organs in chicken: II. spleen and caecum. *J Immunol Immunopathol* 2010; 12(2): 106-13.
22. Mori T, Hoshi H. The periellipsoidal lymphoid tissue in chick spleen: A bursa-dependent area of the white pulp. *Tohoku J Exp Med* 1971; 104(2): 201-2.
23. Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I. Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev Dynamics* 2005; 232(1): 55-66.
24. Ogata K, Sugimura M, Kudo N. Developmental studies on embryonic and posthatching spleens in chickens with special reference to development of white pulp. *Jpn J Vet Res* 1977; 25(3-4): 83-92.
25. Olah I, Glick B. Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *Am J Anat* 1982; 165(4): 445-80.
26. Olah I, Kupper A, Ducz P. Schweigger-Seidel sheath or ellipsoid in the spleen of guinea hen. *Acta Biol Hung* 1994; 45(2-4): 375-86.
27. Olah I, Nagy N, Vervelde L. Structure of the avian lymphoid system. Schat KA, Kaspers B, Kaiser P. eds. In: *Avian Immunology*. London: Academic Press, 2012; pp: 24-9.

28. Olah I, Vervelde L. Structure of the avian lymphoid system. Davison F, Kaspers B, Schat K., eds. In: Avian Immunology. London: Academic Press, 2008; pp: 42-7.
29. Ozoe A, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127(3-4): 259-68.
30. Panda AK, Bhanja SK, Sunder GS. Early post hatch nutrition on immune system development and function in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J* 2015; 71(2): 285-96.
31. Rajput IR, Wu BB, Li LY, Xu X, Cui ZW, Yu DY, Li WF. Establishment of optimal culturing method and biological activity analysis of chicken bone marrow dendritic cells using Chi-rGM-CSF. *IJAB* 2013; 15: 401-9.
32. Tekin ME. Örneklerle Bilgisayarda İstatistik. Konya: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, 2003; pp: 65-80.
33. Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, Davison TF, Young JR. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154 (9): 4485-94.
34. Yasuda M, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S. A comparative study of germinal center: fowls and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21(3): 179-89.



Mısır Silajına Farklı Oranlarda Antep Fıstığı (*Pistacia vera* L.) Dış Kabuğu İlavesinin Silaj Kalitesi ve *In Vitro* Metan Gazı Oluşumu Üzerine Etkisinin Araştırılması*

Esmâ PAYDAŞ¹, Zeliha SAVRUNLU¹, Mehmet SAVRUNLU², Nihat DENEK³

¹Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şanlıurfa-TÜRKİYE

²Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şanlıurfa Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa- TÜRKİYE

³Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Bilim Dalı, Şanlıurfa-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Esmâ PAYDAŞ; E-mail: esma.paydas@tarim.gov.tr; ORCID: 0000-0002-5543-1479

Atf yapmak için: Paydaş E, Savrunlu Z, Savrunlu M, Denek N. Mısır silajına farklı oranlarda Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) dış kabuğu ilavesinin silaj kalitesi ve *in vitro* metan gazı oluşumu üzerine etkisinin araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 16-22.

Özet: Bu çalışma, silajlık mısıra farklı seviyelerde Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) dış kabuğu ilavesinin silaj kalitesi ile *in vitro* metan üretimi (CH₄), *in vitro* organik madde sindirimi (IVOMS) ve metabolik enerji (ME) içeriği üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, kontrol mısır silajı katkısız grubu oluştururken; %3, %6, %9, %12 ve %15 düzeylerinde Antep fıstığı kabuğu içeren silajlar katkılı grupları oluşturular ve tüm silajlar 1.5 L cam kavanozlarda 5'er tekerrür olacak şekilde hazırlandı. Katkısız grup ile kıyaslandığında, Antep fıstığı kabuğunun seviyesinin artışına bağlı olarak *in vitro* CH₄ gazı oluşumunda azalma (P=0.012) görülmüştür. Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajların silaj amonyak azotu (NH₃-N), asetik asit, propiyonik asit ve laktik asit içeriklerinin azaldığı görülmüştür. Bu çalışmada %6, %9, %12 ve %15 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajlarda bütirik asit tespit edilmemiştir (P=0.000). Sonuç olarak gıda endüstrisi yan ürünü olan Antep fıstığı kabuğunun silajlık mısır bitkisine %9 oranında ilave edilerek birlikte silolanabileceği ve ruminal metan gazı üretimini azaltabileceği tespit edilmiştir. Antep fıstığı kabuğunun yem tüketimi ile hayvansal üretim ve performans etkisinin tam olarak ortaya konabilmesi açısından bundan sonraki çalışmalarda *in vivo* hayvan denemelerinin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antep fıstığı kabuğu, *in vitro*, metan, mısır silajı

Investigation of Effect on Silage Quality and *In Vitro* Methane Gas Formation of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Outer Shell with Additional at Different Levels in Corn Silage

Summary: This study was carried out to investigate the effects of the addition of pistachio (*Pistacia vera* L.) outer shells on different levels of silage corn plant on *in vitro* methane (CH₄) production, *in vitro* organic matter digestion (IVOMD) and metabolic energy (ME) content by silage quality. For this purpose, while control maize silage constitutes no additive group; silages containing 3%, 6%, 9%, 12% and 15% pistachio outer shells were prepared to be 5 replicates in 1.5 L glass jars. Compared to the control (no additive) group, the silages obtained showed a decrease in the levels of methane (CH₄) gas production *in vitro* (P<0.05) due to the increase in the level of the pistachio outer shell used as an additive. It was found that the silages that were prepared with the addition of pistachio outer shell decreased ammonia nitrogen (NH₃-N), acetic acid, propionic acid and lactic acid contents (P<0.05). Butyric acid was not detected in the silages prepared with the addition of 6%, 9%, 12% and 15% of pistachio outer shell (P>0.05). As a result, the food industry's by-product Antep pistachio outer shell can be ensiled at 9% level with corn silage material, resulting in the benefit of this by-product and the reduction of ruminal methane production. It has been concluded that *in vivo* animal experiments should also be carried out in order that to be fully demonstrated the effect of feed consumption and animal production and performance of the outer shell of Antep pistachio to be added to the ration.

Key words: Corn silage, *in vitro*, methane, outer shell, pistachio

Giriş

Son yıllarda dünya üzerindeki birçok ülkede iklim değişiklikleri ve su kaynaklarının azalması sonucunda hayvan besleme alanında kullanılan yem maddelerinde fiyat artışları şekillenmiş bunun sonucu olarak da

hayvansal ürünlerin maliyetleri artmıştır (5). Yem maliyetlerindeki artışlara bağlı olarak gıda sanayi yan ürünleri yem kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2017 verilerine göre Antep fıstığının (*Pistacia vera* L.) üretimi 170 bin ton olarak gerçekleşmiştir (42). Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) üretiminde ilk sırayı Güneydoğu Anadolu Bölgesi almakta ve toplam üretimin %91'ini karşılamaktadır. Güneydoğu Anadolu Bölgesini sırasıyla Akdeniz ve Ege Bölgeleri izlemektedir (40). Antep fıstığının dış kabuk miktarı kuru madde olarak

Geliş Tarihi/Submission Date : 12.09.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 12.06.2018

* Bu çalışma Tarım Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenerek TAGEM/15/A05P01/87 nolu projeden üretilmiştir.

meyvenin %8-10 düzeyindedir. Bu veriler ışığında 2016 yılı itibarıyla yaklaşık 40-45 bin ton yaş Antep fıstığı kabuğu Antep fıstığı işleme tesislerinin yan ürünü olarak elde edilmiştir. Antep fıstığı işleme tesislerinden yan ürün olarak elde edilen Antep fıstığı kabuğu önemli miktarda kondanse tanen içermektedir. Tanenler ve fenolik monomerler selülotik ve proteolitik bakteriler üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler (19). Tanenler selülotik mikroorganizmalar üzerine olumsuz etki yaparak asetik asit üretimini azaltırlar, böylece metan üretimi için ihtiyaç duyulan karbondioksit ve hidrojen iyonu üretimini sınırlandırmaktadırlar (34,44). Kondanse tanenler (KT) dolaylı etkileri ile selüloz sindirimini azaltarak metan üretimini düşürürler (18). Bu çalışmanın amacı; mısır hasılına farklı oranlarda Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile elde edilecek silajların kalitelerinin tespit edilmesi ve ruminal metan gazı oluşumu üzerine etkisinin *in vitro* gaz üretim tekniği ile belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Araştırmada kullanılan ana silaj materyali olan mısır hasılı (Tareks, TK-6063) Harran Üniversitesi Hayvancılık Araştırma Ünitesinde ekimi yapılarak hamur olum döneminde silaj makinesiyle partikül büyüklüğü yaklaşık 1 cm olacak şekilde hasat edilmiştir. Silaj katkı maddesi olarak kullanılan Antep fıstığı kabuğu ise Şanlıurfa'da faaliyet gösteren Antep fıstığı işleme tesisinden temin edilmiştir. Mısır hasılı ve katkı olarak kullanılan Antep fıstığı kabuğu 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülerek ham besin madde içerikleri Resmi Analitik Kimya Kurumu'na (AOAC) (1) göre, asit deterjan fiber (ADF) ve nötral deterjan lif (NDF) analizleri ise Van Soest ve ark. (43) tarafından önerilen şekilde yapılmıştır. Mısır hasılı ve Antep fıstığı kabuğunun toplam kondanse tanen (KT) içeriği Makkar ve ark. (26)'larına, suda çözünebilir karbonhidrat tayini (SÇK) Dubois ve ark. (15)'leri tampon kapasitesi tayini Playne ve McDonald'a (35) göre yapılmıştır. Hazırlanan silajlar beşer tekerrür olacak şekilde, katkısız (kontrol) ve kuru madde (KM) esasına göre %3, %6, %9, %12 ve %15 düzeyinde kurutulmuş Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanmıştır. Silajlar 60

günlük fermantasyon oda ısısında karanlık bir ortamda muhafaza edildikten sonra açılarak pH değerleri belirlenmiştir (36). pH ölçümü yapılan sıvıdan silaj amonyak azotu (NH₃-N) ve organik asit (laktik, propiyonik, asetik ve bütirik asit) analizleri için numuneler alınarak derin dondurucuda (-21°C) saklanmıştır. Silajların NH₃-N analizleri Broderick ve Kang (11) tarafından bildirilen yöntemle göre, laktik asit ve uçucu yağ asidi (asetik, propiyonik ve bütirik asit) analizleri ise Suzuki ve Lund'ın (39) bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Araştırmada 24. saat gaz üretim değerlerinin belirlenmesi Menke ve ark. (28)'leri tarafından bildirilen gaz üretim tekniği ile *in vitro* organik madde sindirimi (İVOMS), metabolik enerji (ME) değerleri ise Menke ve ark. (29)'larına göre belirlenmiştir. Bu amaçla rumen sıvısı alınan 3 adet erkek toklu (45-50 kg) 15 gün boyunca Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvancılık İşletmesinde günlük %60 düzeyinde yonca kuru otu ve %40 düzeyinde toklu besi yemi tüketmişlerdir. Hayvanların önünde sürekli taze ve temiz su bulundurulmasına özen gösterilmiştir. *In vitro* inkübasyonda kullanılan rumen sıvısı, rumen sondası yardımıyla sabah yemlemesinden önce alınarak, önceden içerisinde sıcak su ve CO₂ gazı bulunan termos içerisinde çok hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Gaz üretim tekniğinde her bir örnek için beş tekerrür olacak şekilde çalışılmıştır. İnkübasyon 39 °C'de 24 saat sürdürülmüş ve 24. saat gaz oluşum değerleri kaydedilerek, metan gazı ölçüm işlemleri için cam şırıngalarda oluşan gaz, üç yollu plastik şırınga sistemi ile alınmıştır. Alınan gaz bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına (Sensors Europe GmbH, Erkrath, Almanya) enjekte edilerek bilgisayarda metan gazı değeri (%) okunmuştur. Araştırma sonucunda elde edilen veriler SPSS paket programının One-Way ANOVA prosedüründe değerlendirilmiştir. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan karşılaştırma testi kullanılmıştır. Bu amaçla SPSS (38) paket programından yararlanılmıştır.

Bulgular

Araştırmada silaj materyali olarak kullanılan mısır hasılı ile katkı olarak kullanılan Antep fıstığı kabuğu-

Tablo 1. Araştırmada kullanılan mısır hasılı ve Antep fıstığı kabuğunun ham besin madde içerikleri

	KM	HK	OM	HP	ADF	NDF
MH	30.15	5.65	84.40	5.95	27.27	44.38
AFDK	28.54	6.47	86.27	5.78	33.21	37.75

MH: Mısır hasılı; **AFDK:** Antep fıstığı kabuğu; **KM:** Kuru madde, %; **HK:** Ham kül, %; **OM:** Organik madde g/kg KM; **HP:** Ham protein, %; **NDF:** Nötr deterjanda çözünmeyen lif, %; **ADF:** Asit deterjanda çözünmeyen lif, %.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan mısır hasılı ve Antep fıstığı kabuğunun suda çözünebilir karbonhidrat, tamponlama kapasitesi, kondanse tanen (KT), metan gazı, *in vitro* organik madde sindirimi ve metabolik enerji içerikleri

	SÇK	TK	KT	CH ₄	İVOMS	ME
MH	20.35	171	5.33	10.39	50.37	7.60
AFDK	6.88	185	39.51	4.10	35.97	5.39

MH: Mısır Hasılı; **AFDK:** Antep fıstığı kabuğu; **KT:** Kondanse Tanen, g/kg KM; **CH₄:** Metan gazı, toplam gaz üretiminin %'si; **SÇK:** Suda çözünebilir karbonhidrat, g/kg KM; **TK:** Tamponlama kapasitesi, meq/km KM, %'si; **İVOMS:** *In vitro* organik madde sindirimi, % KM; **ME:** Metabolik enerji, MJ/kg KM.

nun besin madde içerikleri Tablo 1'de ile suda çözünabilir karbonhidrat (SÇK), tamponlama kapasitesi (TK) KT içerikleri, *in vitro* CH₄, İVOMS ve ME içerikleri ise Tablo 2'de verilmiştir.

Mısır hasılına farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan silajların besin madde içerikleri Tablo 3'te sunulmuştur.

Mısır hasılına farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan silajların fermantasyon özellikleri Tablo 4'te sunulmuştur.

Çalışmada farklı düzeylerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek elde edilen silajların pH değerleri 3.52-3.57 arasında tespit edilmiştir. Çalışmada %12 ve %15 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan

Tablo 3. Mısır hasılına farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan silajların besin madde içerikleri

Grup	KM	HK	HP	ADF	NDF	OM
Kontrol	26.42 ^e ±0.077	5.73 ^a ±0.126	6.06 ^b ±0.106	28.12 ^a ±0.581	43.86 ^a ±1.192	85.87 ^b ±0.313
%3 AFDK	27.57 ^d ±0.173	5.33 ^b ±0.130	6.30 ^{ab} ±0.290	25.83 ^c ±0.433	41.28 ^{ab} ±0.983	86.83 ^a ±0.272
%6 AFDK	28.20 ^c ±0.186	5.68 ^{ab} ±0.099	5.94 ^b ±0.173	27.44 ^{ab} ±0.546	42.04 ^{ab} ±1.120	86.56 ^{ab} ±0.269
%9 AFDK	29.20 ^b ±0.158	5.44 ^{ab} ±0.118	6.74 ^a ±0.276	26.03 ^{bc} ±0.452	40.03 ^b ±0.667	87.04 ^a ±0.225
%12 AFDK	29.77 ^a ±0.260	5.59 ^{ab} ±0.147	6.14 ^{ab} ±0.182	26.34 ^{bc} ±0.523	41.22 ^{ab} ±1.288	86.65 ^{ab} ±0.280
%15 AFDK	29.93 ^a ±0.188	5.74 ^a ±0.118	6.45 ^{ab} ±0.057	27.42 ^{ab} ±0.391	39.78 ^b ±0.915	86.41 ^{ab} ±0.215
SEM	0.242	0.054	0.089	0.241	0.463	0.119
P Değeri	0.000	0.142	0.091	0.016	0.114	0.081

a-e: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur (P>0.05). **AFDK:** Antep fıstığı kabuğu; **KM:** Kuru madde, %; **HK:** Ham kül, %; **HP:** Ham protein, %; **ADF:** Asit deterjanda çözünmeyen lif, %; **NDF:** Nötr deterjanda çözünmeyen lif, %; **OM:** Organik madde, % KM.

Bu çalışmada katkı maddesi olarak kullanılan Antep fıstığı kabuğu seviyesinin artışına bağlı olarak elde edilen silajların kuru madde (KM) değerleri artmıştır (P=0.00). Çalışmada %9 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan silajın ham protein değeri (%6.74), katkısız gruptan (kontrol-Antep fıstığı kabuğu katılmayan grubu) elde edilen ham protein

nan silajların pH değerleri (3.57-3.56), katkısız gruptan elde edilen pH değerinden yüksek bulunmuştur (P=0.088). Silajların amonyak azotu (NH₃-N) içerikleri değerlendirildiğinde, %3, %6, %9, %12 ve %15 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajların NH₃-N değerleri (%6.58, %6.53, %5.83, %6.33

Tablo 4. Farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan mısır silajlarının fermantasyon özellikleri üzerine etkisi

Grup	pH	NH ₃ -N	LA	AA	PA	BA
Kontrol	3.52 ^b ±0.013	7.62 ^a ±0.644	55.96 ^a ±1.620	12.41 ^a ±0.419	1.22 ^a ±0.096	1.89 ^a ±0.128
%3 AFDK	3.54 ^{ab} ±0.015	6.58 ^{ab} ±0.335	49.71 ^{bc} ±1.171	11.61 ^{ab} ±0.297	0.78 ^b ±0.066	0.14 ^b ±0.0129
%6 AFDK	3.54 ^{ab} ±0.014	6.53 ^{ab} ±0.427	52.68 ^{ab} ±0.671	12.49 ^a ±0.161	0.58 ^{bc} ±0.078	TE
%9 AFDK	3.55 ^{ab} ±0.013	5.83 ^b ±0.376	45.34 ^d ±2.09	10.93 ^b ±0.366	0.45 ^{cd} ±0.105	TE
%12 AFDK	3.57 ^a ±0.013	6.33 ^{ab} ±0.350	47.50 ^{cd} ±1.409	12.09 ^a ±0.282	0.28 ^d ±0.060	TE
%15 AFDK	3.56 ^a ±0.008	5.93 ^b ±0.211	46.77 ^{cd} ±0.479	11.82 ^{ab} ±0.450	0.29 ^d ±0.044	TE
SEM	0.006	0.188	0.846	0.161	0.067	0.131
P Değeri	0.088	0.064	0.000	0.036	0.000	0.000

a-d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur (P>0.05). **AFDK:** Antep fıstığı kabuğu; **pH:** pH değeri; **AA:** Asetik asit, g/kg KM; **PA:** Propiyonik asit, g/kg KM; **LA:** Laktik asit, g/kg KM; **BA:** Bütirik asit, g/kg KM; **NH₃-N:** Amonyak azotu, % NH₃-N /TN; **TE:** Tespit edilemedi.

değerinden (%6.06) yüksek bulunmuştur. Çalışmada %3, %9 ve %12 düzeylerinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek elde edilen silajların ADF değerleri katkısız gruptan elde edilen değerden (%28.12) düşük (P=0.016); NDF değerleri ise %9 ve %15 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi katkısız silajdan elde edilen değerden düşük bulunmuştur (P=0.114). Bu çalışmada tüm seviyelerde ilave edilen Antep fıstığı kabuğu elde edilen silajların organik madde değerlerini yükseltmiştir (P=0.81).

ve %5.93 NH₃-N/TN) katkısız silajdan elde edilen değerden düşük bulunmuştur (P=0.064). Bu çalışmada elde edilen silajların laktik asit değerleri incelendiğinde %6 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajın laktik asit değeri (52.68 g/kg KM) katkısız silajdan elde edilen laktik asit değeri (55.96 g/kg KM) ile benzer bulunurken; diğer katkı gruplarından elde edilen laktik asit değerleri katkısız gruptan elde edilen değerden düşük bulunmuştur (P=0.000). Elde edilen silajların asetik asit değerleri incelendiğin-

de %9 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajın asetik asit değeri (10.93 g/kg KM) katkısız silajdan elde edilen asetik asit değerinden (12.41 g/kg KM) düşük; diğer katkı seviyelerinden elde edilen asetik asit değerleri katkısız silaj ile benzer ($P=0.036$) bulunmuştur. Katkısız silaj ile karşılaştırıldığında Antep fıstığı kabuğu ilavesinin artışına bağlı olarak elde edilen silajların propiyonik asit değerlerinde azalma olduğu görülmüştür. En düşük propiyonik asit değerleri (0.28 g/kg KM ve 0.29 g/kg KM) %12 ve %15 Antep fıstığı kabuğu ilave edilen gruplardan elde edilmiştir ($P=0.000$).

Bu çalışmada silajların Tablo 5 verilen *in vitro* CH₄ değerleri incelendiğinde en yüksek CH₄ değerleri katkısız ve %3 seviyesinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanmış silajlardan (%11.09 ve %10.58) elde edilirken; %6 ve üst seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilavesine bağlı olarak CH₄ oluşumunda azalmalar görülmüştür ($P=0.012$).

Katkısız silaj ile kıyaslandığında %3 ve %9 seviyelerinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilen silajların İVOMS ve ME değerleri katkısız silaj ile benzer bulunurken; diğer gruplardan elde edilen İVOMS ve ME değerleri katkısız gruptan elde edilen değerden düşük bulunmuştur ($P=0.023$ ve $P=0.021$).

Tablo 5. Farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan mısır silajlarının *in vitro* sindirimi ve metabolik enerji özellikleri üzerine etkisi

Grup	CH ₄	İVOMS	ME
Kontrol	11.09 ^a ±0.128	54.07 ^{ab} ±0.871	8.17 ^{ab} ±0.135
%3 AFDK	10.58 ^{ab} ±0.220	55.86 ^a ±0.539	8.46 ^a ±0.085
%6 AFDK	10.45 ^b ±0.176	52.34 ^b ±0.546	7.91 ^b ±0.083
%9 AFDK	10.49 ^b ±0.098	54.51 ^{ab} ±0.607	8.26 ^{ab} ±0.098
%12 AFDK	10.28 ^b ±0.277	52.72 ^b ±1.072	7.97 ^b ±0.165
%15 AFDK	10.06 ^b ±0.106	52.63 ^b ±0.803	7.96 ^b ±0.123
SEM	0.089	0.367	0.057
P Değeri	0.012	0.023	0.021

a-b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur ($P>0.05$) **CH₄:** Toplam üretilen gaz miktarındaki % metan gazı miktarı; **İVOMS:** *In vitro* organik madde sindirilebilirliği, %; **ME:** Metabolik enerji içeriği, MJ/kg KM.

Tartışma ve Sonuç

İzmir İlinde yapılan bir çalışmada silo yemlerinin besin madde içeriği ve silaj kalitesinin saptanması üzerine yapılan bir çalışmada; Mısır silajının kuru madde içeriği ortalama ($n=16$) %29.14±3.77, ADF içeriğinin %47.64 ile %25.06 arasında, NDF içeriğinin ise %43.90 ile %65.07 arasında değiştiği, ham kül (HK) içeriği %4.56 ile %13.46 arasında değişim gösterdiğini saptamıştır (2). Bu çalışmada elde edilen veriler yapılan araştırma ile uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan Antep fıstığı kabuğunun KT içeriği (39.51 g/kg KM); Boğa ve ark. (9)'larının (20.7-26.3 g/kg KM) ve Ghasemi ve ark. (17)'nin tarafından yapılan çalışmalarda değerlerden (8.5 g/kg KM) yüksek bulunmuştur. Antep fıstığı kabuğunda bulunan KT içeriğindeki farklılıklar; Antep fıstığının türü, coğrafi

şartlar, Antep fıstığının yapısındaki çözünebilir şeker miktarı ve hasat zamanına bağlı olarak değişebilmektedir (10). Tanenlerin antibakterial etkileri tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, muhtemelen bu etkilerini metan üretiminde rol oynayan mikroorganizmaların hücrelerindeki enzim ve proteinlerine bağlanarak bakterisid ve bakteristatik etki göstermektedirler (41). Özellikle düşük seviyedeki (%2-3) KT proteinlerin rumende aşırı parçalanmasını önlediği için yararlı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (7). Diğer taraftan yüksek tanen düzeyi proteinlerin sindirimini azaltmasından dolayı zararlı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (20). Tanenler selülotik mikroorganizmalar üzerine olumsuz etki yaparak asetik asit üretimini azaltırlar, böylece metan üretimi için ihtiyaç duyulan karbondioksit ve hidrojen iyonu üretimini sınırlamaktadırlar (34,44).

Bu çalışmada mısır hasılına Antep fıstığı kabuğu ilavesine bağlı olarak elde edilen silajların pH değerleri (3.52-3.57), kaliteli bir silajın taşınması gereken pH değerleri sınırları içerisinde yer almaktadır (24). Katkısız grup ile kıyaslandığında NH₃-N değerleri genel olarak azalmış, bu azalma %9 ve %15 seviyelerinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilen gruplarda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=0.064$). Bu durum tanenlerin polifenolik bileşikler olması ve molekül

ağırlıkları özellikle proteinlerle kompleks bileşik oluşturma kapasiteleri yüksek olması sonucunda, proteinlerin silo içerisinde mikrobiyal yıkımlanma oranlarındaki azalmalardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (8, 37). Silonun iyi sıkıştırılıp, sıkıştırılmaması, silo içerisindeki laktik asit üretim hızı ve silajlık bitkinin kuru madde içeriği silaj NH₃-N düzeyi ile yakından ilişkilidir (14). Makkar ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada KT içeriğinin %2-3 düzeyinde bulunmasının proteinlerin rumende yıkımlanmalarını önleyerek korunmuş protein olarak bağırsaklarda sindirilebilirliklerini arttırdıklarından faydalı olabileceklerini bildirmektedirler. Carpintero ve ark. (12) tarafından yapılan çalışmada silaj NH₃-N değerinin total nitrojen değerinin %11'inden daha düşük seviyede tespit edilmesi durumunda o silajın iyi kaliteli silaj sınıfında

olacağını bildirmektedirler. Bu çalışmada elde edilen silajların $\text{NH}_3\text{-N}$ değerleri genel olarak %11 değerinden düşük bulunmuşlardır. Tanenler silolama sırasında çözünebilir proteinler ile kompleks bileşikler oluşturarak proteinlerin mikroorganizmalar tarafından parçalanmasını önleyerek silajda $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyinin azalmasını sağlamaktadırlar. Böylece silajlarda azot kaybı önlenmekte ve silaj kalitesi yükselmektedir (6,37). Silaj $\text{NH}_3\text{-N}$ değerinin yüksek konsantrasyonda (%12-15 $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ 'den daha yüksek) bulunması, enterobakter ya da clostridia türü bakterilerin artışı sonucu silo içerisindeki proteinlerin yüksek düzeyde yıkımlandığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (22). Bu çalışmada hazırlanan silajların tümünden elde edilen $\text{NH}_3\text{-N}$ değerleri bu değerden düşük bulunmuştur. Bu çalışmada katkısız silaj ile kıyaslandığında Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile elde edilen silajların laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit değerleri azalmıştır. Çalışmada %6, %9, %12 ve %15 seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek elde edilen silajlarda bütirik asit tespit edilmemiş olması elde edilen silajların kalite düzeylerinin iyi olduğu anlamına gelmektedir. Kaliteli bir silajdaki laktik asit düzeyi toplam silaj asitlerinin %65-70 düzeyinde olması gerekmektedir (23). Bu çalışmada, %3, %6, %9, %12 ve %15 düzeylerinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan silajların laktik asit miktarı toplam yağ asitlerine oranları sırasıyla %79, %77, %80, %79 ve %79 olarak tespit edilmiş ve bu değerler Kung'un (23) bildirmesi ile uyumlu ve yakın görülmüştür. Ayrıca çalışmadan elde edilen silaj organik asit değerleri, kaliteli silajlar için bildirilen laktik asit (%4-7), asetik asit (%1-3), propiyonik asit (%0-1) ve bütirik asit (%0) değerleri ile uyumlu veya yakın bulunmuştur (21). Bu çalışmada farklı seviyelerde Antep fıstığı kabuğu ilavesi ile hazırlanan silajların, *in vitro* CH_4 gazı oluşum değerleri %6 ve daha üst seviyelerde istatistiksel olarak azalmıştır ($P<0.05$). Lopez ve ark. (25) tarafından yapılan *in vitro* çalışmalarında kullanılacak katkıların metan gazı üretimi üzerine etkisini araştırmışlar; %11-14 arasında metan gazı oluşturan katkıların düşük, %6-11 arasında metan gazı oluşturan katkıların orta ve %0-6 arasında metan gazı oluşturan katkıların ise yüksek antimetanojenik potansiyellerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada hazırlanan silajlara ilave edilen Antep fıstığı kabuğunun metan üretimi %4.10 olarak tespit edilmiş ve bu değer yüksek düzeyde antimetanojenik etki gösterebilen katkılar grubuna girmektedir. Antep fıstığı kabuğunun yem katkı maddesi olarak kullanıldığı çalışmalardan elde edilen gaz üretim değerlerindeki azalma, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur (5, 31). Tanenler rumendeki proteolitik ve selülotik aktivitenin yanı sıra genel fermentatif aktiviteyi azaltmaktadır. Buna bağlı olarak tanenlerin, rasyondaki karbonhidrat ve proteinlerle kompleks yapı oluşturmasıyla, besin maddelerinin rumende sindiriminde azalmaya sebep olduğu, bu nedenle İVOMS ve ME değerlerinin azaldığı çeşitli çalışmalarda bildi-

rilmiştir (13,16,33). Ghasemi ve ark. (17) tarafından yapılan bir çalışmada, koyun rasyonlarına yonca yerine farklı oranlarda Antep fıstığı kabuğunun kullanılmasıyla; rasyondaki Antep fıstığı kabuğu miktarındaki artışa bağlı olarak rumendeki toplam bakteri ve selülotik bakteri popülasyonunda azalmalar meydana gelmiştir. Tanenlerin rumen protozoalarını baskıladığı ve dolaylı olarak metan oluşumunu azalttığını bildirmektedirler (32). Tanen içeriği yüksek yem maddelerinin sindirilebilirliğinde, mikroorganizmaların kendilerinin yada enzimlerinin tanene bağlanması sonucunda karbonhidratların mikrobiyal parçalanmasının azalması (33) veya yem partiküllerine bağlanan mikroorganizmaların sayılarındaki azalmanın sonucu olarak gaz üretim değerinin düştüğü bildirilmektedir (3). Babayemi ve ark. (4) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* gaz üretim değerlerindeki farklılıkların Antep fıstığı kabuğunun KT, HP ve hücre duvarı içeriği ile ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bohluli ve ark. (10) tarafından yapılan bir çalışmada, Ohadi, Kaleghuchi ve White türlerine ait Antep fıstığı kabuklarının *in vitro* organik madde sindirim değerleri (%67.4, %71.9, %70.9), bu çalışmada silaj katkısı olarak kullanılan Antep fıstığı kabuğu için elde edilen değerden (%35.97) yüksek bulunmuştur. Bu farklılık Antep fıstığı kabuğunun, hasat ve fabrikalarda işlenmesi sırasında dal ve yaprak gibi yapısal karbonhidratları ne düzeyde içerdiklerine bağlanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda (5,30), doğrudan Antep fıstığı kabuğu silajlarında veya Antep fıstığı kabuğu ilave edilen yem maddelerinde *in vitro* gaz üretim değerleri, İVOMS ve ME değerlerindeki azalmalar bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada elde edilen veriler bütün olarak değerlendirildiğinde, %9 düzeyinde Antep fıstığı kabuğu ilave edilerek hazırlanan mısır silajının gerek fermentasyon kriterleri bakımından katkısız silaja kıyasla olumsuz etki göstermemesi; gerekse *in vitro* metan üretimini azaltması bakımından uygun seviye olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, ülkemizin özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde faaliyet gösteren Antep fıstığı işleme fabrikalarından elde edilen Antep fıstığı kabuğunun mısır silajına kuru madde esasına göre %9 düzeyinde ilave edilerek yem kaynağı olarak silolanabileceği ve ruminal metan gazı üretimini azaltmada yararlı olabileceği tespit edilmiştir. Ancak rasyonlara ilave edilecek Antep fıstığı kabuğunun yem tüketimi ile hayvansal üretim ve performans etkisinin tam olarak ortaya konabilmesi açısından *in vivo* hayvan denemelerinin de yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. Eighteen Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

2. Alçiçek A, Tarhan F, Özkan K, Adışen F. İzmir ili ve civarında bazı süt sığırcılığı işletmelerinde yapılan silo yemlerinin besin madde içeriği ve silaj kalitesinin saptanması üzerine bir araştırma. Hay Üret 2014; 40(1): 54-63.
3. Alipour D, Rouzbehan Y. Effects of several levels of extracted tannin from grape pomace on intestinal digestibility of soybean meal. Livestock Sci 2010; 128(1-3): 87-91.
4. Babayemi OJ, Demeyer D, Fievez V. Nutritive value and qualitative assessment of secondary compounds in seeds of eight tropical browse, shrub and pulse legumes. Commun Agric Appl Biol Sci 2004; 69(1): 103-10.
5. Bagheripour E, Rouzbehan Y, Alipour D. Effects of ensiling, air-drying and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production of pistachio by-products. Anim Feed Sci Technol 2008; 146(3-4): 327-36.
6. Barry TN, Manley TR. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in *Lotus* sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. J Sci Food Agric 1986; 37(3): 248-54.
7. Barry TN. Secondary compounds of forages. Hacker JB, Ternouth JH eds. In: Nutrition of Herbivores. First Edition. Sydney: Academic Press, 1987; pp. 91-120.
8. Barszcz M, Skomial J. Possibilities of tannins utilization in the protection of animals and human health. Post Nauk Roln 2011; 2: 95-110.
9. Boga M, Guven I, Atalay AI, Kaya E. Effect of varieties on potential nutritive value of pistachio hulls. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(4): 699-703
10. Bohluli A, Naserian AA, Valizadeh R, Shahroodi FE. Proceedings of British Society of Animal Science. Scarborough, UK: BSAS, 2007; p. 223.
11. Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J Dairy Sci 1980; 63(1): 64-75.
12. Carpintero CM, Henderson AR, McDonald P. The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. Grass For Sci 1979; 34(4): 311-5.
13. Cortes JE, Morenob B, Pabon ML, Avila P, Kreuzer M, Hess HD, Carulla JE. Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and post-ruminal degradation of soybean meal as estimated in vitro. Anim Feed Sci Technol 2009; 151(3-4): 194-204.
14. Davies DR, Merry RJ, Williams AP, Bakewell EL, Leemans DK, Tweed JKS. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. J Dairy Sci 1998; 81(2): 444-53.
15. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28(3): 350-6.
16. El-Waziry AM, Nasser MEA, Sallam SMA, Abdallah AL, Bueno ICS. Processing methods of soybean meal, 2. Effect of autoclaving and Quebracho tanin treated-soybean meal on gas production and rumen fermentation in vitro. J Appl Sci Res 2007; 3(1): 17-24
17. Ghasemi S, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasebi AM, Vakili AR, Behgar M, Ghovvati S. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. Small Rumin Res 2012; 104(1): 94-8.
18. Goel G, Makkar HPS. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. Trop Anim Health Prod 2012; 44(4): 729-39.
19. Goel G, Puniya AK, Singh K. Xylanolytic activity of ruminal *Streptococcus bovis* in presence of tannin acid. Ann Microbiol 2005; 55(4): 295-7.
20. Kumar R, Singh M. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. J Agr Food Chem 1984; 32(3): 447-53.
21. Kung LJR, Shaver RD. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. For Forag 2001; 3(13): 1-5.
22. Kung LJR. Silage fermentation end products and microbial populations: their relationships to silage quality and animal productivity. Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. September, 25-27, 2008; Charlotte; NC-USA.
23. Kung LJR. Understanding the biology of silage preservation maximize quality and protect the environment. Proceedings. California Alfalfa-Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference. 2010; Visalia; CA-USA.
24. Leterme P, Thewis A, Culot M. Supplementation of pressed sugar beet pulp silage with molasses and urea, laying hen excreta or soybean meal in ruminant nutrition. Anim Feed Sci Technol 1992; 39(3-4): 209-25.

25. Lopez S, Makkar HPS, Soliva CR. Screening plants and plant products for methane inhibitors. Vercoe PE, Makkar HPS, Schlink A, eds. In: *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra Nutritional Attributes in Ruminants. New York: USA: Nuclear and Related Methodologies, 2010; p. 191.
26. Makkar HPS, Blümmel M, Becker K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br J Nutr* 1995; 73(6): 897-913.
27. Makkar HP. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin Res* 2003; 49(3): 241-56.
28. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 1988; 28: 7-55.
29. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding-stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J Agric Sci* 1979; 93(1): 217-22.
30. Mohammadabadi T, Chaji M. The influence of the plant tannins on *in vitro* ruminal degradation and improving nutritive value of sunflower meal in ruminants. *Pak Vet J* 2012; 32(2): 225-8.
31. Mokhtarpour A, Naserian AA, Tahmasbi AM, Valizadeh R. Effect of feeding pistachio by-products silage supplemented with polyethylene glycol and urea on Holstein dairy cows performance in early lactation. *Livestock Sci* 2012; 148(3): 208-13.
32. Moss AR, Jouany JP, Newbold J. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann Zootechnol* 2000; 49(3): 231-53.
33. Muhammed S, Stewart CS, Acamovic T. Effects of tannic acid on cellulose degradation, adhesion and enzymic activity of rumen microorganisms. *Proc Soc Nutr Physiol* 1994; 3: 25.
34. Patra AK, Saxena J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Anton Leeuw* 2009; 96(4): 363-75.
35. Playne MJ, Mc Donald P. The buffering constituent of herbage and of silage. *J Sci Food Agric* 1966; 17(6): 264-8.
36. Polan CE, Stieve D, Garrett J. Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia or microbial inoculant. *J Dairy Sci* 1998; 81(3): 765-76.
37. Santos GT, Oliveira RL, Petit HV, Cecato U, Zeoula LM, Rigolon LP, Damasceno JC, Branco AF, Bett V. Effect of tannic acid on composition and ruminal degradability of Bermuda grass and alfalfa silages. *J Dairy Sci* 2000; 83(9): 2016-20.
38. SPSS. Inc. Statistical package for the social sciences (SPSS/PC+), 1991, Chicago, IL.USA
39. Suzuki M, Lund CW. Improved gas-liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage. *J Agric Food Chem* 1980; 28(5): 1040-1.
40. Oruç Ş. Antep Fıstığı Sektör Etüdü, İstanbul Ticaret Borsası, <https://slidex.tips/download/antepfistii-sektr-etd-aban-oru-do-ticaret-ubesi-mart-2003>, Erişim tarihi: 15.08.2017.
41. Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. Methane production from *in vitro* rumen incubation with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 123-124(1): 403-19.
42. Türkiye İstatistik Kurumu. Türkiye Antep Fıstığı Üretimi İstatistikleri, www.tuik.gov.tr, Erişim tarihi: 15.07.2017.
43. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74(10): 3583-97.
44. Waghorn GC. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Anim Feed Sci Technol* 2008; 147(1-3): 116-39.



The Inhibition Effects of Eugenol and Pulegone on *Stenotrophomonas maltophilia*: an Opportunistic Pathogen

Tuba BAYGAR¹, Nurdan SARAC², Aysel UGUR³, Taçnur BAYGAR⁴, Uydu BALCI²

¹Mugla Sitki Kocman University, Research Laboratories Center, Material Research Laboratory, Muğla-TURKEY

²Mugla Sitki Kocman University, Faculty of Science, Department of Biology, Muğla-TURKEY

³Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Basic Sciences, Section of Medical Microbiology, Ankara-TURKEY

⁴Mugla Sitki Kocman University, Faculty of Fisheries, Department of Seafood Processing Technology, Muğla-TURKEY

*Corresponding author: Dr. Tuba BAYGAR; E-mail: tubaygar@mu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-1238-3227

How to cite: Baygar T, Sarac N, Ugur A, Baygar T, Balci U. The inhibition effects of eugenol and pulegone on *Stenotrophomonas maltophilia*: An opportunistic pathogen. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 29-35.

Summary: Aerobic, non-fermentative and Gram-negative *Stenotrophomonas maltophilia* is a multidrug-resistant bacilli that is known to be pathogen for human and animals. *S. maltophilia* has been isolated from different animal species and also found in a variety of environments including soil, water, and plants. *S. maltophilia*, which has the ability to form biofilms on surfaces that cause environmental problems, is resistant to many antibiotic classes such as cephalosporins, carbapenems, and aminoglycosides. Here in this study, its aimed to determine the inhibition activities of natural phenolic compounds eugenol and pulegone against *S. maltophilia* MU69. Antibacterial activities of eugenol and pulegone were initially determined by disc diffusion method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were also determined by tube dilution assay. Antibiofilm activities of the compounds were investigated by crystal violet staining and also monitored using Scanning Electron Microscopy (SEM). Zone of inhibition measurements were found to be 39 mm and 28 mm for eugenol and pulegone, respectively. MIC and MBC values were found to be 3.12 mg/mL for eugenol while these were 2.5 mg/mL and 5 mg/mL for pulegone, respectively. The highest antibiofilm activity was found to be 56.30±0.45% for MIC of eugenol. To our knowledge, this is the first report of the antibacterial and antibiofilm activity of eugenol and pulegone against *S. maltophilia*. According to the biological activity results, it can be concluded that these natural agents may be potentially used for veterinary sciences, food industry or pharmaceutical applications that aim to manage *S. maltophilia* biofilm.

Key words: Antibacterial, antibiofilm, eugenol, pulegone, *S. maltophilia*.

Eugenol ve Pulegonun Fırsatçı Patojen Bir Bakteri Olan *Stenotrophomonas maltophilia*'ya Karşı İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Özet: Aerobik, non-fermentatif ve gram-negatif *Stenotrophomonas maltophilia*, insan ve hayvanlar için patojen olarak bilinen çoklu ilaç direncine sahip bir basildir. Farklı hayvan türlerinden izole edilmiş *S. maltophilia* suşu toprak, su ve bitkiler gibi çeşitli çevresel etmenlerden de izole edilebilmektedir. Katı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilme yeteneği sayesinde *S. maltophilia* suşu çevre sorunlarına yol açmakla birlikte aminoglikozitler, karbapenemler ve sefalosporinler gibi çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı direnç göstermektedir. Bu çalışmada doğal fenolik bileşikler olan eugenol ve pulegonun *S. maltophilia* MU69 suşu üzerindeki inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Eugenol ve pulegonun antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) ise tüp dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesinde kristal viyole boyama yöntemi uygulanmış ve ayrıca Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile görüntülenmiştir. Eugenol ve pulegon için inhibisyon zonu sırasıyla 39 mm ve 28 mm olarak ölçülmüştür. MİK ve MBK değerleri eugenol için 3.12 mg/mL olarak belirlenirken, pulegon için sırasıyla 2.5 mg/mL ve 5 mg/mL olarak tespit edilmiştir. En yüksek antibiyofilm aktivite oranı % 56.30±0.45 ile eugenole ait MİK değeri için gözlenmiştir. Bu çalışma eugenol ve pulegon bileşiklerinin *S. maltophilia* suşuna karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin belirlendiği ilk çalışma olarak sunulmaktadır. Biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçlarına göre bu iki doğal bileşik veteriner bilimlari, gıda endüstrisi ve farmasötik uygulamalarda *S. maltophilia*'ya karşı geliştirilen sistemlerde potansiyel kullanım kapasitesine sahiptir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel, antibiyofilm, eugenol, pulegon, *S. maltophilia*.

Introduction

There is a growing interest in the use of herbal products as an alternative to standard medical therapies. Plants contain various type of bioactive compounds

and secondary metabolites that play an important role for using throughout alternative pharmaceutical approaches. Some of these compounds are found in essential oils isolated from plants. Essential oils have distinctive fragrances and/or flavours and are used in cosmetic as well as medical applications (38). Essential oils (EOs) are aromatic and volatile liquids ex-

tracted from plant materials, such as flowers, roots, bark, leaves, seeds, peel, fruits, wood, and whole plant (19). Essential oils (EOs) can be isolated from by several techniques such as water or steam distillation, solvent extraction, expression under pressure, supercritical fluid extraction, subcritical water extraction, ultra-sound assisted extraction, microwave assisted extraction (7). The main constituents of EOs are mono- and sesquiterpenes, along with carbohydrates, phenols, alcohols, ethers, aldehydes, and ketones, which are responsible for the biological activity of aromatic and medicinal plants as well as for their fragrance (37). Eugenol (2-allyl-4-methoxyphenol) is a phenolic compound that can be obtained from a wide range of plant sources including clove oil, nutmeg oil, cinnamon extract and many other plants (28). The pharmaceutical functions of essential oils isolated from various plants have also thought to be due to the presence of eugenol (36). Eugenol is known to be effective against a number of lifestyle related threats including nervous disorders, digestive complications, reproductive derangements, blood cholesterol irregularity, hyper-tension, elevated blood glucose level, microbial infections, inflammatory actions and carcinogenesis (45). Antioxidant (25), antimicrobial (2), anti-inflammatory (29), anticancer (43), anti-diabetic (39), neuroprotective (35), and antihypercholesterolemic (42) activities of eugenol have been reported. Pulegone [Cyclohexanone; 5-methyl-2-(1-methylethylidene)-] is a monoterpene ketone present in the leaves and flowering tops of several members of the mint family *Lamiaceae*. Pulegone is reported to be the major constituent of, *Mentha pulegium* (22), *M. longifolia* (34), and *Micromeria cilicica* (18). As a pharmacologically active compound, pulegone found to have antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* (18). Gram-negative bacterial pathogens, as *Stenotrophomonas maltophilia*, are often multiple-drug-resistant organisms (MDROs) due to multidrug resistance pumps, plasmids harboring antibiotic resistance genes, and various gene transfer mechanisms involved in the acquisition of antimicrobial resistance (9). *S. maltophilia* which is generally associated with respiratory infections in humans is considered as a nosocomial bacterium (1), but there have been reports of *S. maltophilia* associated with community acquired infections (9). *S. maltophilia* was considered to be the cause of fleece rot in sheep (31), septicemia in crocodiles (23) and the snubnose dart (*Trachinotus ovatus*) (47), ulcerative stomatitis in captive snakes (17), lymphadenitis in goats (26), infectious intussusception syndrome (IIS) in channel catfish (21), gill disease in sea bream (27), and lower airway disease in horses and dogs (1). *S. maltophilia* has the ability to adhere to solid surfaces such as plastics and form bacterial films (biofilms). The drug resistance mechanisms of the *S. maltophilia* are acquired by the horizontal transfer of antibiotic re-

sistance through plasmids (5), transposons (6), integrons (24), efflux pumps, melanin-like pigment and biofilm formation (30).

The published sequence of the *S. maltophilia* genome shows numerous resistance genes, such as genes encoding for multidrug-efflux pumps, β -lactamases, and aminoglycoside-modifying enzymes (13). Discovery of the new strategies to treat the *S. maltophilia* infections has been gaining importance for a long time. In this study, its aimed to determine the antimicrobial and antibiofilm activities of eugenol and pulegone against *S. maltophilia* MU69 as a natural alternative to the use of antibiotics.

Material and Methods

Materials

Eugenol and pulegone were purchased from Sigma-Aldrich. Mueller Hinton Agar (MHA), Tryptic Soya Broth (TSB) and D-Glucose were purchased from Merck. *S. maltophilia* MU69 strain was provided from Mugla Sıtkı Kocman University Culture Collection and was incubated at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$ for 24 h. Inocula was prepared adjusting the turbidity of the medium to match the 0.5 McFarland standard dilutions. The strain was maintained in its appropriate agar slants at 4°C throughout the study and used as stock culture. Eugenol and pulegone concentrations were prepared with 10 % DMSO as two-fold serial dilutions.

Disc Diffusion Assay of Eugenol and Pulegone

The antimicrobial activity was measured based on the disc diffusion method using pour-plating technique (12). 20 mL of MHA (Merck) sterilized and cooled to $45-50^\circ\text{C}$. After injecting 1000 μL microorganism cultures to sterile plates, media was distributed and mixed homogenously. Sterile 6 mm paper discs (Schleicher and Schuell) were impregnated with 20 μL of pure eugenol and pulegone and were then placed on the inoculated agar. The plates were incubated at appropriate temperature for performing the bacteria, as mentioned above. At the end of the incubation period, diameters of growth zones around the discs were measured. The experiments were performed in triplicate.

Tube Dilution Method

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of eugenol and pulegone were determined by tube dilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (11). *S. maltophilia* was grown in Mueller-Hinton Broth (MHB) at 37°C overnight and diluted to 5×10^5 colony forming unit (CFU)/mL. Eugenol/ Pulegone solutions (200 μL)+microorganism (20 μL)+culture media (1800 μL) were inoculated into a glass tubes and incubated for 24 h. 10% DMSO is

used as negative control. The MIC was defined as the lowest concentration of eugenol/pulegone showing no turbidity (no visible growth of microorganism). 100 µL cell suspensions from the tubes with no turbidity were poured onto Mueller-Hinton Agar (MHA) plates and incubated overnight and the MBC was defined as the lowest concentration of eugenol/pulegone at which bacteria did not grow on agar media. The experiments were performed in triplicate.

Effect on biofilm formation

The effect of eugenol and pulegone on biofilm-forming ability of *S. maltophilia* were tested by a microplate biofilm assay (33). Bacterial strain was prepared as above, but Trypticase Soy Broth (TSB) supplemented with 5% D-glucose was used as culture media. Cultures diluted to 1:100 in fresh TSB with 5% D-glucose. Totally 200 µL bacteria suspension and MIC and MIC/2 of eugenol and pulegone were incubated in sterile microplate at 37°C for 48 h. After incubation, the wells were washed with distilled water twice to remove the planktonic bacteria. The remaining bacteria was subsequently stained with 0.1% crystal violet solution for 10 minutes. Wells were washed again to remove the excess crystal violet solution. After air-

mentioned above. Control group was incubated without eugenol or pulegone addition. After incubation period at 37 °C for 48 h, the coverslips were gently rinsed with PBS (pH 7.4) and fixed with 2.5% glutaraldehyde at 4 °C for 2 h. Following the glutaraldehyde fixation, the coverslips were washed again with PBS for 1 h and dehydrated by increasing concentrations of ethanol. Specimens were air-dried and coated by gold (Emmitech K550, UK) before examining with a SEM (JEOL, JSM-7600F; JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Results

Zone of inhibition measurements were found to be 39 mm and 28 mm for eugenol and pulegone, respectively. MIC and MBC values were found to be 3.12 mg/mL (both are the same) for eugenol while these were 2.5 mg/mL and 5 mg/mL for pulegone, respectively.

The MIC value of eugenol obtained in this study was found to be same as the MBC value, which suggests that eugenol is bacteriostatic and bactericidal at 3.12 mg/mL concentration. On the other hand, pulegone was found to be bacteriostatic at lower concentration (2.5 mg/mL) than its bactericidal concentration (5 mg/

Table 1. MIC and MBC values of eugenol and pulegone against *S. maltophilia*

	Eugenol (mg/mL)	Pulegone (mg/mL)
MIC	3.12	2.50
MBC	3.12	5.00

*mg/mL: miligram/milliliters

drying, 200 µl of ethanol were added to each well and incubated at room temperature for 10 m. 125 µl solution from each well transferred to another sterile tube and the final volume was adjusted to 1 mL with distilled water. Optical density of the solutions was measured at 550 nm (Multiskan GO UV/Vis Microplate Spectrophotometer, Thermo-Fisher Scientific, USA). The effect of eugenol and pulegone on biofilm formation of *S. maltophilia* was calculated with the following equation:

$$\% \text{ Antibiofilm Effect} = \frac{[(\text{Control}_{OD} - \text{Sample}_{OD}) / \text{Control}_{OD}] * 100}$$

where control is the cell suspensions of bacteria containing 10% DMSO without eugenol/pulegone. The experiments were performed in triplicate.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

To monitorize the antibiofilm activity, the highest biofilm inhibition was also observed by SEM using glass coverslips and compared with the control group (8). Sterile circle glass coverslips (20×20 mm) were placed in biofilm assay tubes which were prepared as

mL) (Table 1).

Within the results of this study, the highest antibiofilm activity was found to be 56.30±0.45% for MIC of eugenol (Figure 1). Inhibition effect of pulegone was slightly lower than eugenol (39.31±0.79%). Antibiofilm activity of subMIC concentrations were similar for

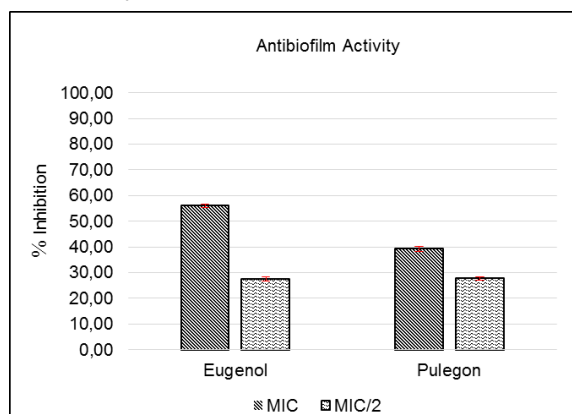


Figure 1. Antibiofilm activity of eugenol and pulegone against *S. maltophilia*. Error bars represent the standard error of the means from three biological replicates

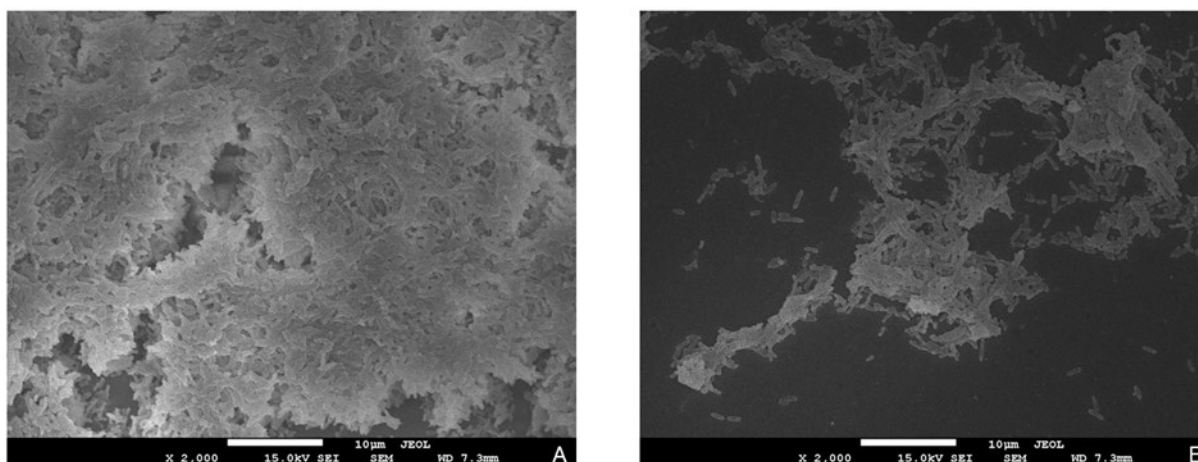


Figure 2. SEM images of *S. maltophilia* biofilm inhibition of eugenol at MIC concentration All images are taken at x2000 magnification. A: Control, B: Eugenol treatment

both eugenol and pulegone.

As the highest biofilm inhibition rate was observed for MIC of eugenol ($56.30 \pm 0.45\%$) *S. maltophilia* biofilm layer incubated with MIC of eugenol was also observed by SEM (Figure 2). The biofilm formation on the control group glass coverslips which did not contain eugenol (Figure 2A) were highly intense and it was clear that bacteria cells colonized and accumulated into the biofilm matrix. For the eugenol-incorporated group, the microbial adhesion onto the glass coverslips were found to be decreased (Figure 2B). These findings are the observable proof of the antimicrobial and antibiofilm activity of eugenol against *S. maltophilia*. As the biofilm inhibition rate was found to be lower, *S. maltophilia* biofilm formation with pulegone incorporation was not monitored using SEM.

Discussion and Conclusion

Within the results of this study, eugenol found to be more effective against *S. maltophilia* than pulegone. Similar studies revealed out that eugenol exhibits an excellent bactericidal activity against a wide range of organisms like *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (44), *Listeria monocytogenes* (20), and *Salmonella typhi* (16). Recent reports about the antimicrobial susceptibility of *S. maltophilia* strains revealed that trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT), chloramphenicol, minocycline and levofloxacin are active antibiotics for the treatment of the infections caused by *S. maltophilia* (10,14). According to the literature data, there has been limited study on the antibacterial activity of eugenol and pulegone against a MDRO like *S. maltophilia*, so, the present study is an important data. MIC is the lowest concentration of the drug that allows no visible growth and MBC is defined as the lowest concentration of the drug that kills nearly 99.9% of the original inoculum (32). The MIC and MBC experi-

ments revealed the least concentrations at which eugenol and pulegone act as bacteriostatic and bactericidal agent against *S. maltophilia*, respectively. *S. maltophilia* isolates often display high-level multidrug resistance (41). Recent evidence indicates that antibiotic efflux may be a contributing factor to the intrinsic and acquired multidrug resistance of *S. maltophilia* (3). It is supposed that an effective antibiotic therapy of *S. maltophilia* infections may require the targeting of efflux mechanisms, in order to render the organism more susceptible to available antimicrobial agent (46). Bacterial biofilms are formed when planktonic organisms come together to form a community which attaches to a solid surface and encased in an exopolysaccharide matrix (32). There are a few studies about the antibiofilm activity of eugenol and pulegone for evaluating their clinical usage. Al-Shabib et al. (4) reported eugenol as a broad-spectrum anti-quorum sensing and antibiofilm agent against toxin producing biofilm forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In a study of Upadhyay et al. (40), it is suggested that eugenol could potentially be used to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing environments. Biofilm formation by *S. maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections has been investigated by researchers. De Oliveira-Garcia et al. (15) suggested that flagella and fimbriae 1 (SMF-1) produced by *S. maltophilia* can be involved in biofilm formation of the bacteria. Recently, natural plant-derived extracts are investigated for their activity on eradication of the biofilm formation of microorganisms. As far as we know, this is the first study about the antibiofilm activity of eugenol and/or pulegone against *S. maltophilia* strain. According to Brooke (9), there is ongoing debate about the use of monotherapy versus combination therapy to treat infections of *S. maltophilia*, so new treatment strategies have included the use of select antibiotics in synergy. Euge-

nol or pulegone may be suggested as an alternative synergistic compounds to enhance the mechanism of antibiotics.

In conclusion, antibiotics play an important role for medical treatment. However, there is growing crisis due to the antimicrobial resistance of microorganisms against the antibiotic drugs used in the pharmaceutical applications. Researchers now focus on the investigations of naturally occurring molecules with antimicrobial and antibiofilm activity. This study results figured out that both eugenol and pulegone are highly active against *S. maltophilia* strain which has been known as multidrug-resistant bacteria. In respect to the higher inhibition zone and antibiofilm activity results, eugenol may be a clinically important compound to be tested with further analysis such as toxicity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug interactions.

Acknowledgements: This study was presented at the "2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technichs (ICAVST), October 4-8, 2017, Skopje, Macedonia" as an oral presentation.

References

- Albini S, Abril C, Franchini M, Hüseyin D, Filioussis G. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the airways of animals with chronic respiratory disease. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2009; 151(7): 323-8.
- Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, Ahmed N. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4(20): 1-7.
- Alonso A, Martinez JL. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1140-2.
- Al-Shabib NA, Husain FM, Ahmad I, Baig MH. Eugenol inhibits quorum sensing and biofilm of toxigenic MRSA strains isolated from food handlers employed in Saudi Arabia. *Biotechnol Bio-technol Equip* 2017; 31(2): 387-96.
- Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(2):413-9.
- Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh TR. ATEM-2₁-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(6): 879-84.
- Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012; 17(4): 3989-4006.
- Baygar T, Ugur A. *In vitro* evaluation of antimicrobial and antibiofilm potentials of silver nanoparticles biosynthesized by *Streptomyces griseorubens*. *IET Nanobiotechnol* 2017; 11(6): 667-81.
- Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(1): 2-41.
- Chung HS, Hong SG, Kim YR, Shin KS, Whang DH, Ahn JY, Lee HS. Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates. *J Korean Med Sci* 2013;28 (1): 62-6.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM, eds, *Microbiological Methods*, 7th ed, Butterworths, London, 1995; p.493.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Adlem E. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 2008; 9(4): 1-13.
- Çikman A, Parlak M, Bayram Y, Güdücüoğlu A, Berktaş M. Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. *Afr Health Sci* 2016; 16 (1): 149-52.
- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz A, Alcántara N, Martinez M, Girón J. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* 2003; 5: 625-36.
- Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(1): 107-15.
- Draper CS, Walker RD, Lawler HE. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179(11): 1223-6.
- Duru ME, Öztürk M, Uğur A, Ceylan Ö. The constituents of essential oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J Eth-*

- nopharmacol 2004; 94(1): 43-8.
19. El Abed N, Kaabi B, Smaali MI, Chabbouh M, Habibi K, Meiri M, Ben Hadj Ahmed S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014:1-12.
 20. Filgueiras CT, Vanetti MCD. Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49(3): 405-9.
 21. Geng Y, Wang K, Chen D, Huang X, He M, Yin Z. *Stenotrophomonas maltophilia*, an emerging opportunist pathogen for cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in China. *Aquaculture* 2010; 308(3): 132-5.
 22. Harborne JB, Baxter H, Moss GP. *Dictionary of Plant Toxins*. Chichester. John Wiley and Sons, 1996; p. 310-1.
 23. Harris NB, Rogers DG. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*). *J Vet Diagn Investig* 2001; 13(3): 255-8.
 24. Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(3): 230-4.
 25. Ito M, Murakami K, Yoshino M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol* 2005; 43(3): 461-6.
 26. Johnson EH, Busaidy R, Hameed MS. An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *J Vet Med B* 2003; 50(2): 102-4.
 27. Kapetanovic D, Kurtovic B, Vardic I, Teskeredzic E, Teskeredzic Z. Gill disease in a gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Medycyna Wet* 2006; 62(11): 1239-41.
 28. Khalil AA, ur Rahman U, Khan MR, Sahar A, Mehmood T, Khan M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Advances* 2017; 7(52): 32669-81.
 29. Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park EJ, Kim Y, Park HJ, Lee SK (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. *Life sciences* 2003; 73(3): 337-48.
 30. Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(2): 126-30.
 31. MacDiarmid JA, Burrell DH. Characterization of *Pseudomonas maltophilia* isolates from fleece rot. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51(2): 346-8.
 32. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9(1): 34-9.
 33. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 2005; 22(1): 1-18.
 34. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *J Food Sci* 2009; 74(7): 358-63.
 35. Prasad SN. Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. *Neurochem Res* 2013; 38(2): 330-45.
 36. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001; 15(3): 159-164.
 37. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules* 2010; 15(11): 7532-46.
 38. Sousa DPD, Nóbrega FF, de Lima MR, Almeida RND. Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Z Naturforsch C* 2011; 66(7-8): 353-9.
 39. Srinivasan S, Sathish G, Jayanthi M, Muthukumar J, Muruganathan U, Ramachandran V. Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 385(1-2): 159-68.
 40. Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology* 2013; 36(1): 79-89.
 41. Vartivarian S, Anaissie E, Bodey G, Sprigg H, Rolston KA. Changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents:

- implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 624-7.
42. Venkadeswaran K, Muralidharan AR, Annadurai T, Ruban VV, Sundararajan M, Anandhi R, Geraldine P. Antihypercholesterolemic and antioxidative potential of an extract of the plant, Piper betle, and its active constituent, eugenol, in triton WR-1339-Induced hypercholesterolemia in experimental rats. *Evid Based Complementary Altern Med* 2014; 1-11.
 43. Vidhy N, Devaraj SN. Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer cells. *Indian J Exp Biol* 2011; 49(11): 871-78.
 44. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2003; 94(2): 240-7.
 45. Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* 2010; 268(3): 204-12.
 46. Zhang L, Xian-Zhi L, Poole K. Multiple Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a Multidrug Efflux System. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(2): 287-93.
 47. Zhou YC, Zhu, CH, Zhang B. Isolation and prevention of the pathogen causing large scale death on *Trachinotus ovatus*. *Mar Sci* 2001; 25(4): 40-4.



Rat Epididimal Spermasının Kısa Süreli Saklanması Farklı Sıcaklık Dereceleri ve Karnitinin Etkileri*

Mustafa YEŞİL¹, Serpil SARIÖZKAN²

¹Çamardı İlçe Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Niğde-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Serpil SARIÖZKAN; E-mail: serpilsariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5224-2341

Atf yapmak için: Yeşil M, Sarıözkan S. Rat epididimal spermasının kısa süreli saklanması farklı sıcaklık dereceleri ve karnitinin etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 36-43.

Özet: Bu çalışmanın amacı, kısa süreli saklanan (0., 6., 12., 24. ve 48. saat) rat epididimal spermasında farklı saklama derecelerinin (4 °C ve 37 °C) ve karnitinin spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmaktır. Araştırmada sperma donörü olarak 10 adet 8-10 haftalık yaş ve 200-250 g ağırlıklarında Wistar-Albino erişkin rat kullanıldı. Epididimiler anestezi altındaki ratlardan cerrahi teknikle alındı. Epididimal sperma numuneleri önce 4 ayrı gruba ayrıldı, numuneler Tris (T) ve Tris + 2 mM karnitin (TC) ile sulandırıldı. Ardından sulandırılan sperma numuneleri 4 °C (T - TC) ve 37 °C (T - TC) de 48 saat süreyle kısa süreli saklandı. Saklama süresinin ardından motilite ve anormal spermatozoa oranı analiz edildi. Uygulama 10 kez tekrar edildi. Çalışmanın sonucunda, tüm deneysel gruplarda 48. saat sonunda anormal spermatozoa oranında artış ve motilite oranında düşme saptandı. Her iki sıcaklık derecesinde motilite ve spermatozoa morfolojik yapısının karnitin katılan gruplarda (TC) daha iyi korunduğu belirlendi. Sonuç olarak, 4 °C deki motilite oranı 37 °C ye kıyasla daha yüksek ve anormal spermatozoa oranı ise daha düşük bulundu.

Anahtar kelimeler: Epididimal sperma, karnitin, kısa süreli saklama, rat, spermatolojik parametreler

The Effect of Different Temperature and Carnitine on Liquid Storage of Rat Epididymal Semen

Summary: The aim of this study was to investigate the effects of different storage temperatures (4 °C and 37 °C) and carnitine on spermatological parameters in liquid stored (0, 6, 12, 24 and 48 h) rat epididymal semen. In the study, 10 Wistar-Albino rats aged 8-10 weeks and weighing 200-250 g were used as semen. Epididymides of the rats were removed by surgical technique under anaesthesia. Firstly, epididymal semen samples were divided into four groups and samples were diluted with Tris (T) and Tris + 2 mM carnitine (TC). Then diluted semen samples stored in liquid up to 48 h at 4 °C (T - TC) and 37 °C (T - TC). After the storage time, the percentage of motility and abnormal spermatozoa were analyzed. Applications were replicated ten times. In the study it was observed while the percentage of abnormal spermatozoa increased, the percentage of motility decreased at the end of the 48 h in all experimental groups. At both temperatures, it was determined that motility and morphologic structure of spermatozoa were better protected in carnitine supplemented groups (TC). In conclusion, the percentage of motility at 4 °C were higher and the percentage of abnormal spermatozoa were lower than at 37 °C.

Key words: Carnitine, epididymal semen, liquid storage, rat, spermatological parameters

Giriş

Spermanın soğutulmuş kısa süreli ve dondurularak uzun süreli saklanması spermatozoanın canlılığının korunması amacıyla pek çok türün spermasında uygulanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında ve evcil hayvanlarda spermanın dondurularak saklanması ve bu dondurulmuş spermanın suni tohumlama uygulamalarında kullanılması üstün genetik kapasiteye sahip neslin devamını sağlamaktadır. Dondurma tekniğinin kullanım alanlarının oldukça çeşitli ve geniş olması evcil olmayan hayvanlarda örneğin rodentlerde de kullanımını da sağlamaktadır (28,44). Reprodüktif materyallerin dondurularak saklanması hayvan yetiştirme programları, insan infertilite uygulamaları ve biyome-

dikal araştırmalara da fayda sağlamaktadır (17). Biyomedikal çalışmalarda laboratuvar hayvanları sıklıkla kullanılmaktadır. Fareler ve ratlar biyomedikal çalışmaların %97 sini oluşturmaktadır (2,27). Fare ve ratların doğal yolla üretilmeleri ve barındırılmalarının kolay olmasına rağmen, genetik olarak modifiye edilmiş ırkların üretilmeleri ve transportu oldukça maliyetli ve zordur (25). Bu zorluk, üretilmelerinde doğal yolun kullanılmasına yol açmakla birlikte spermanın dondurulması tekniği de çeşitli ırkların genetik materyallerinin uzun süreli saklanması ve transportunu kolaylaştıran ve rodent ırklarının muhafazasındaki maliyeti azaltan önemli bir biyotekniktir (5,9). Spermanın kısa süreli ve uzun süreli saklanması tekniği pek çok memeli türünde kullanılıyor olmasına karşın bazı rodent türlerinde zorluklar bulunmaktadır (44). Rodent türlerinden fare ve rat spermatozoasının birbirine benzer özelliklerinin bulunmasına rağmen rat

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.03.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 12.06.2018

*Bu çalışma aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

spermatozoasının mekanik strese duyarlılığının ve membran geçirgenliğinin farklı olması nedeniyle farelerde uygulanan sperma saklama protokolleri ratlara adapte edilememiştir (36). Rat spermatozoasının uzun bir kuyruğa sahip olması, baş yapısındaki ve membran lipid kompozisyonundaki farklılık soğuk şokuna karşı aşırı duyarlı olmasına yol açmaktadır (15,20,22). Bu sebeplerden dolayı kabul edilebilir ve tekrarlanabilir rat spermatozoa saklama protokolü bulunmamaktadır (45). Spermanın dondurularak saklanması tekniği, spermatolojik parametrelerde geri dönüşümsüz hasarlara ve sonuçta fertilizasyon kapasitesinde azalmaya yol açtığından ratlarda kullanımı sınırlıdır (11). Spermanın soğutulması ve dondurularak saklanması sırasında oksidatif stress oluşmaktadır. Oluşan oksidatif stres etkisiyle aşırı üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) de spermatozoa plazma membranlarında yağ asitleri ve fosfolipitlerde lipid peroksidasyona yol açarak kalıcı hasarlar oluşturmaktadır (13,24). Spermatozoa ve seminal plazmada bulunan antioksidanlar ile hücre kendi yapısını oksidatif strese karşı korumaya çalışmaktadır (24). Ancak bu koruma spermatozoa yapısına bağlı olarak sınırlı olduğundan spermanın saklanması sırasında sulandırıcılara antioksidan ilaveleri yapılmaktadır (3,7). Rat spermasında da başarılı saklama protokollerinin geliştirilmesi amacıyla yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır (9,19,20,21). Rat epididimal spermatozoasında kısa süreli saklama çalışmalarının bulunmasına rağmen antioksidan madde olan karnitin kullanıldığı ve farklı saklama sıcaklık derecelerinin test edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; ratlarda epididimal spermanın kısa süreli saklanması sırasında farklı sıcaklık dereceleri ve sperma sulandırıcısına katılan karnitinin spermatolojik parametreler üzerine etkilerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (No: 15/137) tarafından onaylanmış olup Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Sperma donörü olarak 10 adet 8-10 haftalık, 200-250 g ağırlıklarında Wistar-Albino erişkin rat kullanıldı. Çalışma, ergin erkek ratların epididimal spermaları üzerinde yürütüldü.

Örnek Toplama ve Epididimal Spermanın Sulandırılması

Çalışmada kullanılacak olan ratlardan ketamin/ksilazin anestezisi altında, testis üreme organı dışarıya alınıp yağ dokularından arındırıldıktan sonra epididimis yapısı ayırıldı. Sağ ve sol kauda epididimisler petri kutusu içerisindeki 1 ml fizyolojik tuzlu suda (% 0.9'luk NaCl) bistüri ve makas yardımıyla iyice parçalanarak epididimal dokudaki spermatozoonların

sıvıya geçmesi sağlandı. Epididimal spermanın sulandırılması amacıyla Tris buffer solüsyonu [Trisma base (T6066, Sigma-Aldrich, Co) 3.63 g, glukoz 0.50 g, sitrik asit 1.99 g ve distile su 100 ml pH 7 ye ayarlanmıştır] hazırlandı (22,23). Epididimal sperma numuneleri 4 ayrı gruba ayrılarak final konsantrasyonu $1-3 \times 10^7$ /mL spermatozoa olacak şekilde tris sulandırıcı (T) ve 2 mM karnitin (C0283, Sigma-Aldrich, Co) katılmış tris sulandırıcısıyla (TC) sulandırılarak 4 °C de (T ve TC grubu) ve 37 °C de (T ve TC grubu) olmak üzere 5 farklı sürede (0, 6, 12, 24, 48 saat) bekletildi. Tüm gruplar beş farklı süre sonunda motilite ve anormal spermatozoa oranı gibi spermatolojik yönden analiz edildi.

Spermatolojik Muayeneler

Spermatozoa motilitesi: Belirtilen sürelerin sonunda sulandırılmış sperma örneklerinden küçük bir damla lam üzerine alınıp üzerine lamel kapatılarak ısıtma tablası 37 °C'ye ayarlanmış mikroskopun 400'lük büyütmesinde subjektif yolla motilite oranı belirlendi. Motilite analizleri üç farklı mikroskopik saha incelenerek yapıldı. Bu üç farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplandı (37).

Anormal spermatozoon oranı: Tüm deney gruplarında beş farklı saklama süresinin sonunda anormal spermatozoa oranının belirlenmesi amacıyla; temiz, kuru ve önceden ısıtılmış (37 °C) bir lama bir damla sperma numunesi ve birkaç damla Eozin-Nigrozin (1.67 g eozin, 10 g nigrozin, 2.9 g sodyum sitrat ve 100 ml distile su) karışımı boya damlatılarak bir lam yardımıyla karıştırılıp homojen hale getirildi. Daha sonra bu sperma-boya karışımından ince frotiler çekilerek çok kısa sürede kuruması sağlandı. Kurutma işleminin ardından frotiler mikroskopun 400'lük büyütmesinde incelendi. Bir frotide toplam 300 spermatozoon incelenerek baş, kuyruk ve toplam anormal spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edildi (39).

İstatistikî Analizler

Deneysel çalışmalar 10 kez tekrar edildi. 4 °C ve 37 °C gibi iki farklı sıcaklıklarda saklanan Tris ve Tris+Karnitin grupları arasındaki farklılığın önem kontrolünü karşılaştırmak için Mann Whitney U testi ile 0., 6., 12., 24., 48. saatler arasındaki farklılığın önem kontrolünde Friedman testi, ikili karşılaştırmalarda ise Wilcoxon testi kullanıldı. İstatistik analizler IBM SPSS 22 programı ile yapıldı.

Bulgular

İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa motilitesi üzerine karnitinin etkileri Tablo 1' de gösterildi. 4 °C de saklanan rat spermasında, T ve TC gruplarında; 0. ve 6. saatte kaydedilen motilite oranları 48. saattekiyle kıyaslandığında istatistikî açıdan ciddi bir düşme kaydedildi ($P < 0.001$). Rat epididimal spermasının 37

Tablo 1. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa motilite oranı (%) üzerine karnitinin etkileri

Sıcaklık	Grup	N	Saat [Medyan (%25-%75)]					P değeri (Friedman test)
			0. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
4° C	Tris (T)	10	78 ^a (70.8-80.8)	30 ^a (27.9-35.0)	20.8 ^{ab} (20.0-25.8)	11.0 ^{bc} (10.0-12.0)	5.0 ^c (4.0-5.0)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	75.5 ^a (72.5-80.7)	60.5 ^{ab} (55.0-65.0)	43.3 ^b (38.8-46.7)	20.0 ^{bc} (18.8-21.5)	10.0 ^c (7.8-10.0)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.912	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
37° C	Tris (T)	10	80.0 ^a (70.0-80.0)	20.0 ^{ab} (19.6-21.0)	13.3 ^{bc} (10.0-15.0)	6.0 ^{bc} (5.0-8)	4.0 ^c (0.0-5.0)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	75.0 ^a (70.0-80.0)	40.0 ^{ab} (38.3-45.0)	30.0 ^b (28.7-31.6)	10.0 ^{bc} (10.0-11.7)	5.5 ^c (5.0-7.8)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.853	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Friedman Test). Sütunlar arası gruplarda önemlilik Mann Whitney U test sonuçlarına göre değerlendirildi.

Tablo 2. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa baş bölge anomali oranı (%) üzerine karnitinin etkileri

Sıcaklık	Grup	N	Saat [Medyan (%25-%75)]					P değeri (Friedman test)
			0. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
4 °C	Tris (T)	10	3.0 ^a (1.8-3.3)	4.0 ^a (3.0-4.3)	6.0 ^{ab} (6.0-7.0)	13.0 ^{bc} (11-14.3)	23.0 ^c (21.8-26)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	2.5 ^a (1.8-3.3)	3.0 ^a (2-3.3)	5.0 ^{ab} (4.0-6.0)	14.0 ^{bc} (12.8-15.0)	21.0 ^c (20-22.3)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.505	0.056	0.010	0.233	0.032	
37 °C	Tris (T)	10	2.0 ^a (2.0-3.0)	7.0 ^{ab} (5.8-7.5)	22.5 ^{bc} (21.0-24.0)	35.0 ^{cd} (34.0-36.0)	38.0 ^d (37.0-39.3)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	2.0 ^a (1.0-3.3)	3.5 ^a (2.8-4.3)	13.0 ^{ab} (11.8-13.3)	24.5 ^b (24-25.3)	27.5 ^b (24.5-29.3)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.751	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Friedman Test). Sütunlar arası gruplarda önemlilik Mann Whitney U test sonuçlarına göre değerlendirildi.

Tablo 3. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa kuyruk anomali oranı (%) üzerine karnitinin etkileri

Sıcaklık	Grup	N	Saat [Medyan (%25-%75)]					P değeri (Friedman test)
			0. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
4 °C	Tris (T)	10	3.0 ^a (1.8-4.3)	7.0 ^{ab} (6.0-7.0)	9.0 ^{ab} (8.0-9.3)	12.8 ^{bc} (14.0-15.0)	25.0 ^c (20.5-26.3)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	3.0 ^a (2-4)	4.0 ^{ab} (3.75-5)	7.5 ^b (6.75-9.25)	9.5 ^b (9-10.25)	14.0 ^c (13-15)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.786	<0.001	0.150	<0.001	<0.001	
37 °C	Tris (T)	10	3.0 ^a (1.8-4.0)	8.0 ^{ab} (6.8-9.0)	11.0 ^{bc} (10.0-13.0)	24.0 ^c (24.0-25.0)	26.0 ^c (24.8-29.3)	<0.001
	Tris+Karnitin (TC)	10	3.5 ^a (2.0-4.0)	6.5 ^{ab} (5.0-7.0)	8.0 ^{ab} (7.0-9.0)	13.0 ^{bc} (11.8-14.0)	22.5 ^c (20.8-23.3)	
	P değeri (Mann Whitney U test)		0.432	0.017	<0.001	<0.001	0.002	

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Friedman Test). Sütunlar arası gruplarda önemlilik Mann Whitney U test sonuçlarına göre değerlendirildi.

Tablo 4. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa toplam morfolojik anomal oranı (%) üzerine karnitinin etkileri.

Sıcaklık	Grup	N	Saat [Medyan (%25-%75)]					P değeri (Friedman test)
			0. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
4 °C	Tris (T)	10	6.0 ^a (4.0-7.3)	10.5 ^{ab} (9.0-11.3)	15.0 ^{bc} (14.0-16.3)	26.5 ^{cd} (25.0-28.5)	47.0 ^d (45.5-49.5)	<0.001
	Tris+ Karnitin (TC)	10	5.5 ^a (4.0-7.0)	7.0 ^a (6.0-8.0)	12.5 ^{ab} (12.0-14.0)	23.0 ^{bc} (22.3-25.3)	35.0 ^c (34.0-36.3)	
P değeri (Mann Whitney U test)			0.671	<0.001	0.014	0.005	<0.001	
37 °C	Tris (T)	10	5.5 ^a (4.5-6.3)	14.0 ^{ab} (13.0-17.0)	34.0 ^{bc} (32.8-34.5)	59.0 ^c (58.8-60.0)	64.0 ^c (61.3-67.5)	<0.001
	Tris+ Karnitin (TC)	10	6.0 ^a (4.8-6.3)	10.0 ^{ab} (8.0-11.0)	20.5 ^{bc} (19.8-22.0)	37.5 ^{cd} (37.0-38.0)	49.0 ^d (46.8-53.0)	
P değeri (Mann Whitney U test)			0.726	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Friedman Test). Sütunlar arası gruplarda önemlilik Mann Whitney U test sonuçlarına göre değerlendirildi

°C de T ve TC gruplarının her ikisinde de ilerleyen saklama süresi sonunda motilite oranında ciddi düşmeler kaydedildi (P<0.001). T ve TC grupları karşılaştırıldığında, 4 °C de TC grubunda 6. saatten itibaren 48. saate kadar ilerleyen farklı saklama süreleri boyunca T grubuna kıyasla istatistiki açıdan farklı ve yüksek bir motilite oranı gözlemlendi (P<0.001). 37 °C'de T ve TC grupları kendi aralarında kıyaslandığında, her iki grupta da 0. saatte kaydedilen motilite oranı istatistiki olarak benzer iken (P>0.05), diğer saatlerde TC grubunda kaydedilen motilite oranları T grubuna kıyasla istatistiki açıdan daha yüksek bulundu (P<0.01; P<0.001). Çalışmada, 4°C de karnitin katılan TC grubunda diğer tüm gruplara kıyasla daha yüksek motilite oranı kaydedildi. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal sperm baş bölge anomalisi üzerine karnitinin etkileri Tablo 2' de gösterildi. Rat epididimal sperması 4 °C ve 37 °C'de T ve TC gruplarının her ikisinde de 48. saate doğru ilerleyen saklama süresince spermatozoa baş anomalisi oranında istatistiki açıdan önemli bir artış gözlemlendi (P<0.001). 4 °C' de 12. ve 48. saatlerde, 37 °C'de 6., 12., 24. ve 48. saatleri arasında baş anomalisi oranı TC grubunda istatistiki olarak daha düşük kaydedildi. İki farklı sıcaklık derecesinde (4 °C ve 37 °C) kısa süreli saklanan rat epididimal sperm kuyruk anomalisi üzerine karnitinin etkileri Tablo 3' de gösterildi. Her iki saklama sıcaklık derecelerinde saatlere göre değerlendirme yapıldığında; T ve TC gruplarının her ikisinde de saklama periyodunun ilerlemesiyle kuyruk anomalisi oranında önemli derecede artış gözlemlendi (P<0.001). 4 °C de saklanan TC grubunda 6., 24., ve 48. saatlerde, 37 °Cde saklanan TC grubunda da 6., 12., 24., ve 48. saatlerde T grubuna kıyasla istatistiki olarak daha

düşük anomal oranı kaydedildi. İki farklı sıcaklık derecesinde kısa süreli saklanan rat epididimal spermatozoa toplam morfolojik bozukluklar üzerine karnitinin etkileri Tablo 4' de gösterildi. Saatlere göre değerlendirme yapıldığında T ve TC gruplarında ilerleyen zamanla beraber spermatozoanın toplam anomal oranında istatistiki açıdan anlamlı bir artış saptandı (P<0.001). T ve TC grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında; 4 °C ve 37 °C' de yapılan kısa süreli saklamanın 6., 12., 24., ve 48. saatlerinde TC grubunda istatistiki olarak daha düşük toplam morfolojik anomal oranı kaydedildi, 4 °C' nin morfolojik yapıyı korumada 37 °C' ye kıyasla daha etkin olduğu saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Spermanın saklanmasında iki önemli prosedür kullanılmaktadır. Bunlardan biri kısa süreli saklama diğeri ise uzun süreli dondurularak saklamadır. Sperma saklama prosedürlerinin ortak amacı saklama süresi boyunca spermatozoa canlılığında devamlılığının sağlanmasıdır. Spermatozoanın canlılığını koruyan ve devamlılığını sağlayan spermanın uygun sulandırıcılarla sulandırılması ve saklama sıcaklığının düşürülmesidir. Bu durum, spermatozoa metabolizmasının yavaşlamasını, fertil yaşam süresinin uzatılmasını ve sperma saklama protokolünün başarıya ulaşmasını sağlamaktadır (29,47).

Yapılan bu çalışmada, rat epididimal spermasının kısa süreli saklanması süresince ilerleyen zamana bağlı olarak spermatolojik parametrelerden motilite ve anormal spermatozoa oranında şekillenen değişimler ve bu değişimler üzerine karnitinin etkileri gösterildi.

Pek çok rat ırkının spermasının dondurulmasına iliş-

kin çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışmaların farklı araştırma grubu ve laboratuvarlarında tekrarlanmalarında sıkıntılarının olduğu bildirilmektedir (46).

Yapılan çalışmada, saklama saatlerine göre değerlendirme yapıldığında T ve TC gruplarında iki farklı saklama sıcaklığında da saklama süresinin 0. saatten 48. saate doğru ilerlemesiyle beraber motilite oranında ciddi bir düşme gözlemlendi. Bu durum, rat spermatozoonunun ebatlarına, non sferik şekillerine bağlı olarak soğutma işlemlerinde zorlukların olmasına ve hücrelerin biyofiziksel cevaplarının farklılık göstermesine bağlanmaktadır (18). Rodent sperm karakterleri memeli spermatozoasından membran lipid içeriği, kompozisyonu ve uzun kuyruk yapısındaki farklılığa bağlı olarak değişiklik göstermektedir (29,30). Bu nedenle, rat spermi santrifüjasyon, pH, viskozite, osmotik basınç gibi çevresel değişimlere de oldukça duyarlıdır (31,34,36,41). Soğutmayla beraber şekillenen soğuk şokunun etkisiyle rat spermatozoasında geri dönüşümsüz hasarlar oluşmakta, membran kolesterol içeriklerinde farklılık meydana gelmekte ve sonuç olarak membran akışkanlığı ve su geçirgenliğini değiştirmektedir (19). Memeli spermatozoası metabolik ihtiyaçları için gereken enerjiyi hem mitokondrial oksidatif respirasyon hem de glikolizis sayesinde sağlamaktadır. Bu enerjinin, yeterli ve sürekli sağlanması flagellumun hareketi yani spermatozoa motilitesi için gereklidir (12). Bu nedenle sperma sulandırıcılarına enerji sağlayıcı katkı maddelerinin eklenmesi spermatozoa fonksiyonları için gereken ATP sentezlenmesinde önemli olduğu ve dondurma-çözdürme sonu soğuk hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmektedir (46). Rat spermatozoasının membran ve morfolojik yapısında saklama süresinin ilerlemesiyle beraber gözlenen bozukluklar motilite kaybını da indüklemektedir. Çünkü spermatozoonun orta kısmında oksidatif fosforilasyona bağlı olarak ATP sentezlenmesinde görevli aksonemlerce çevrelenmiş mitokondriolar bulunmaktadır. Üretilen bu enerji de sperm metabolizması ve sperm motilitesinde kullanılmaktadır (38).

Çalışmamızda rat epididimal spermatozoasında gözlenen baş ve kuyruk bölge morfolojik anomalileri mitokondriadaki hasara da yol açabileceğinden motilite kaybıyla karşıımıza çıkabilmektedir. Spermanın soğutulması safhasında oluşan soğuk şoku etkisiyle motilitedeki kayıplar rat (34,41), tavşan (34) ve koçlarda (14) gösterilmiştir. Rat spermatozoası ve testis dokusunun dondurulabilirliği ve çözüm sonu yaşama gücü ile reproduktif yeteneği de oldukça kısıtlıdır (30). Çalışmanın motilite sonuçlarına göre, her iki saklama sıcaklığında da (4 °C ve 37 °C) saklama süresinin 48. saate doğru ilerlemesiyle beraber önemli derecede motilite kaybının olduğu, 4 °C'nin 37 °C'ye kıyasla motiliteyi daha iyi koruduğu söylenebilmektedir. Bu durum, spermatozoanın soğutulmasıyla beraber metabolizmasını yavaşlatarak motilite ve fertil yaşam süresinin uzatmasına bağlanmaktadır (29,47). Çalış-

mamızın motilite sonuçları, Varışlı ve ark.'nın (43) çalışmaları sonucunda elde ettikleri motilite sonuçlarına benzerlik göstermesine karşın 4 °C nin diğer saklama derecelerine kıyasla daha hasar verici buldukları sonucundan farklılık göstermektedir. Bu durum, çalışmamızda kullanılan rat ırkının farklı oluşuna ve sulandırıcıda kullandığımız karnitin olumlu etkisinin gözlenmesine bağlanmıştır. Çalışmamızda, her iki saklama sıcaklığında da karnitin katılan gruplarda sadece trisle sulandırılan gruplara kıyasla motilitenin önemli derecede iyi korunduğu saptanmıştır. Bu durum, karnitinin önemli bir antioksidan madde olmasına ve saklama süresince şekillenen lipid peroksidasyona karşı antioksidatif özellik göstermesine bağlanmıştır. Spermanın in vitro manipülasyonu süresince soğutma ve dondurma gibi işlemlere maruz kalması spermada reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açmaktadır (6). Reaktif oksijen türleri oksijen metabolizmasının bir ürünü olarak karışımza çıkar ve spermatozoada plazma membranı ve mitokondrioları düzeyinde oluşur. Sonucu mekanizma, spermatozoadaki ROS'un temel kaynağıdır. Çünkü, spermatozoada motilite için gerekli enerjiyi sağlayabilmek amacıyla çok sayıda mitokondria bulunmaktadır. Spermada spermatozoa fonksiyon bozukluklarında ROS düzeyi önemli derecede artmaktadır bu da mitokondrial fonksiyonu bozarak motilite gibi tüm spermatozoa fonksiyonlarını geri dönüşümsüz hasara uğratmaktadır (1,21). Aşırı ROS üretimini dengede tutmak amacıyla seminal plazma ve spermatozoada doğal antioksidanlar bulunmaktadır (35). Ancak kısıtlı miktarlarına bağlı olarak sperma sulandırıcılarına antioksidan ilaveleri yaygın şekilde yapılmaktadır (3,16). Çalışmamızda karnitin kullanılmış gruplarda motilitenin sadece tris ile sulandırılan gruplara kıyasla daha iyi korunması da antioksidanların ROS oluşumunu engellemeleri ya da direkt yok etmeleri ile spermatozoa plazma membranındaki lipidlerin korunmasına ve dolayısıyla spermatozoa motilite ve canlılığının muhafazasını sağladığı bilgisiyyle paralellik göstermektedir (26). Sarıözkan ve ark.'nın (34) kısa süreli saklamanın yapıldığı tavşan spermasında 0.5 mM dozda karnitin saklamanın 12. saatinde motilite, akrozomal ve membran bütünlüğünde önemli derecede koruma sağladığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmanın sonucu belirtilen çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, karnitin kullanıldığı, boğa spermanın dondurulması-çözdürülmesi sonrası motilite üzerine olumlu etkisinin gösterildiği çalışma ile de paralellik göstermektedir (8).

Yapılan çalışmada rat epididimal spermasının iki farklı saklama sıcaklığında kısa süreli saklanmasında saklama süresinin ilerlemesiyle beraber baş, kuyruk ve toplam anormallik oranının artış gösterdiği, karnitin ilave edilen gruplarda sadece trisle sulandırılan gruplara kıyasla istatistik açıdan önemli derecede koruyucu etki yaptığı ve 4 °C' de normal morfolojik yapı bütünlüğünün 37 °C' ye kıyasla daha iyi korunduğu tes-

pit edildi. Çalışmanın sonuçları, kısa süreli saklamada ilerleyen zamana bağlı olarak tavşanlarda (35) ve bizonlarda (23) motilite, canlılık ve normal morfolojiye sahip spermatozoa oranında ciddi kayıpların olduğu ve rat epididimal spermasının 4 °C de soğutulmasının akrozomal bütünlük üzerine zarar verici etkisi olmadığına dair çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir (41).

Sonuç olarak, sperma soğutulması süresince şekillenen soğuk şoku nedeniyle spermatozoa membran yapısı ve ortamın ozmotik yapısı değişikliğe uğramaktadır. Bu değişiklikler, kısa süreli saklama süresince ilerleyen zamanın da etkisiyle spermatolojik özellikleri olumsuz etkilemektedir. Sperma sulandırıcılarına antioksidatif özelliğe sahip ajanların katılması spermatolojik özellikleri korumaktadır. Yapılan çalışmada 4 °C ve 37 °C lerde kısa süreli saklama süresince ilerleyen zamana karşı rat spermatolojik parametrelerinden motilite oranında düşme, baş, kuyruk ve toplam spermatozoa morfolojik anomalilikler oranında artış olduğu ancak, 4 °C' de muhafaza edilen ve karnitin ilave edilmiş gruplarda spermatolojik parametrelerin sadece trisle sulandırılan gruplara kıyasla daha iyi korunduğu tespit edilmiştir.

Kaynaklar

1. Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014; 32(1): 1-17.
2. Ağca Y, Critser JK. Assisted reproductive technologies and genetic engineering in rats, Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (eds). In: *The Laboratory Rat*. San Diego: Academic Press, 2005; pp.165-90.
3. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-97.
4. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4): 659-68.
5. Audrins P, Holden CA, McLachlan RI, Kovacs GT. Semen storage for special purposes at monash IVF from 1977 to 1997. *Fertil Steril* 1999; 72(1): 179-81.
6. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21(1): 1-7.
7. Beconi MT, Affranchino MA, Schang LM, Beorlegui NB. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochem Int* 1991; 23(3): 545-53.
8. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroğlu A, Öztuna D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 2010; 61(3): 248-53.
9. Buehr M, Hjorth JP, Hansen AK, Sandoe P. Genetically modified laboratory animals-what welfare problems do they face? *J Appl Anim Welf Sci* 2003; 6(4): 319-38.
10. Cardullo RA, Baltz JM. Metabolic regulation in mammalian sperm: Mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; 19(3): 180-8.
11. Charreau B, Tesson L, Soullou JP, Pourcel C, Anegon I. Transgenesis in rats: Technical aspects and models. *Transgenic Res* 1996; 5(4): 223-34.
12. Cummins JM, Woodall PF. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 1985; 75(1): 153-75.
13. Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2011; 9 (1): 73-83.
14. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, Ataman MB, Ömür AD, Güngör Ş, Küçükünay S, Özkalp B, Sarıözkan S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci* 2010; 89(3): 426-31.
15. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Bischof JC. Subzero Water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biol Reprod* 1999; 61(3): 764-75.
16. Gadea J, Garcia-Vazquez F, Matas C, Gardon JC, Canovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl* 2005; 26(3): 396-404.
17. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12(1): 101-6.
18. Hagiwara M, Choi JH, Devireddy RV, Roberts KP, Wolkers WF, Makhlof A, Bischof JC. Cellular biophysics during freezing of rat and mouse sperm predicts post-thaw motility. *Biol Reprod* 2009; 81(4): 700-6.
19. Hall JC, Hadley J, Doman T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipid, protein and

- the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl* 1991; 12(1): 76-87.
20. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11(1): 73-88.
 21. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13(1): 43-52.
 22. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53(1): 47-58.
 23. Karunakaran M, Dhali A, Mech A, Khate K, Rajkhowa C, Mishra DP. Preservation of mithun (*Bos frontalis*) semen at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci* 2006; 101(3-4): 257-64.
 24. Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16(4): 235-9.
 25. Landel CP. Archiving mouse strains by cryopreservation. *Lab Anim (NY)* 2005; 34: 50-7.
 26. Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(5): 638-59.
 27. Lazar J, Moreno C, Jacob HJ, Kwitek AE. Impact of genomics on research in the rat. *Genome Res* 2005; 15: 1717-28.
 28. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002; 57(1): 303-26.
 29. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: A review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5(6): 613-38.
 30. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: Importance, impact, status and future directions. *Biol Reprod* 2008; 78(1): 2-12.
 31. Nakatsukasa E, Kashiwazaki N, Takizawa A, Shinno M, Kitada K, Serikawa T, Hakamata Y, Kobayashi E, Takahashi R, Ueda M, Nakashima T, Nakagata N. Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies and inbred spontaneous mutant and transgenic strains of rats. *Comp Med* 2003; 53(6): 639-41.
 32. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29(2): 255-66.
 33. Sariözkan S, Bucak MN, Cantürk F, Özdamar S, Yay A, Tuncer PB, Özcan S, Sorgucu N, Caner Y. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 °C. *Cryobiology* 2012; 65(2): 93-7.
 34. Sariözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 2014; 68(3): 349-53.
 35. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48(6): 835-50.
 36. Si W, Benson JD, Men H, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology* 2006; 53(3): 336-48.
 37. Sonmez M, Turk G, Yuce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male wistar rats. *Theriogenology* 2005; 63(7): 2063-72.
 38. Suarez SS, Marquez B, Harris TP, Schimenti JC. Different regulatory systems operate in the midpiece and principal piece of the mammalian sperm flagellum. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 331-4.
 39. Turk G, Ateşşahin A, Sönmez M. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67(4): 778-85.
 40. Turk G, Ceribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(4): 587-96.
 41. Varişli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. Effect of chilling on the motility and acrosomal integrity of rat sperm in the presence of various extenders. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009; 48(5): 499-505.
 42. Varişli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. *J Androl* 2009; 30(1): 75-86.
 43. Varişli Ö, Ağca C, Ağca Y. Short-term storage of rat sperm in the presence of various extenders. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2013; 52(6): 732-7.
 44. Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, De Kruif A. Storage of fresh bovine semen in a diluent based on the ionic composition of

- cauda epididymal plasma. *Reprod Dom Anim* 2004; 39(6): 410-6.
45. Yamashiro H, Han YJ, Sugawara A, Tomioka I, Hoshino Y, Sato E. Freezability of rat epididymal sperm induced by raffinose in modified Krebs-Ringer bicarbonate (mKRB) based extender solution. *Cryobiology* 2007; 55(3): 285-94.
46. Yamashiro H, Sato E. Cryopreservation of rat sperm. Katkow I. ed. In: *Current Frontiers in Cryopreservation*. London: IntechOpen, 2012; pp. 165-78.
47. Yoshida M. Conservation of sperm: Current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 2000; 60(61): 349-55.



Determination of Hepatitis A Virus, *Enterobacteriaceae*, Coliform and *Escherichia coli* Contamination of Frozen Raspberries*

Gökhan Kürşad İNCİLİ¹, Ahmet KOLUMAN², Abdullah DİKİCİ³

¹Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Elazığ-TURKEY

²Pamukkale University, Technology Faculty, Department of Biomedical Engineering, Denizli-TURKEY

³Uşak University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Uşak-TURKEY

*Corresponding author: Dr. Gökhan Kürşad İNCİLİ; E-mail: gkincili@firat.edu.tr; ORCID: 0000-0003-1178-3365

How to cite: İncili GK, Koluman A, Dikici A. Determination of hepatitis A virus, *Enterobacteriaceae*, coliform and *Escherichia coli* contamination of frozen raspberries. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 44-48.

Summary: Hepatitis A is transferred via fecal-oral route, direct contact from person to person or with ingestion of contaminated food. Foods like, raspberries, strawberries and blueberries are important source of hepatitis A virus (HAV). Frozen retail packaged raspberries are analyzed in this study. Frozen raspberry samples have been obtained from local supermarkets monthly between January and December 2015 in Ankara province, Turkey. The samples were evaluated for HAV contamination using ISO/TS 15216-1:2013 in duplicate and Mengovirus was used for process control. Samples that found to be contaminated with HAV were further analyzed for *Enterobacteriaceae* Coliform and *Escherichia coli*. Totally 240 samples were analyzed and 20 (8.33%) were found to be contaminated with HAV. The highest HAV prevalence was on 6th month (25%). On the contrary no HAV was found on 3rd, 4th and 10th months of analyzes. The highest *Enterobacteriaceae*, Coliform and *E. coli* counts were found on 2nd month 4.90, 4.84 and, 3.48 log₁₀ cfu/g, respectively. The results indicate that even the food relies with the microbiological criteria, there is no guarantee for viral contamination. Additionally, high cost of virus analyzes is another barrier for routine control which has a direct impact on public health. Additional measures like HACCP, GHP and GMP should be applied strictly from farm to fork to avoid contamination with HAV.

Key words: Coliform, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, hepatitis A, raspberries

Dondurulmuş Ahududularda Hepatit A Virüs, *Enterobacteriaceae*, Koliform ve *Escherichia coli* Kontaminasyonunun Belirlenmesi

Özet: Hepatit A virüsü (HAV), genellikle fekal-oral yolla, kişiden kişiye direkt temas veya kontamine gıda ve suyun alınmasıyla bulaşmaktadır. Dondurulmuş ahududu, çilek ve yabanmersini gibi üzüksü meyveler kategorisinde yer alan ürünler, HAV kontaminasyonu açısından önemli kaynaklar arasında yer almaktadır. Bu çalışmada piyasada paketlenmiş olarak satılan dondurulmuş ahududu örnekleri kullanılmıştır. Dondurulmuş ahududu örnekleri, 2015 yılında Ankara'da bulunan marketlerden Ocak-Aralık ayları arasında her ay 20 tane olacak şekilde toplanmıştır. Çalışma konusunu oluşturan ahududu örneklerinde HAV analizi ISO/TS 15216-1:2013 uygun olacak şekilde iki paralel olarak yapılmıştır ve proses kontrolü için Mengovirüs kullanılmıştır. HAV pozitif bulunan örneklerde *Enterobacteriaceae*, Koliform bakteri ve *E. coli* sayımları gerçekleştirilmiştir. Toplam 240 adet ahududu örneğinin 20 adetinin (%8,33) HAV pozitif olduğu tespit edilmiştir. En yüksek prevalansın 6. ayda (%25) olduğu tespit edilirken, 3, 4 ve 10. aylarda alınan örneklerde ise HAV bulunmamıştır. En yüksek *Enterobacteriaceae*, koliform ve *E. coli* sayılarının 2. ayda olduğu ve bu ayda sırasıyla 4,90, 4,84 ve 3,48 log₁₀ kob/g bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar gıdaların mikrobiyolojik kriterlere göre bakteriyel ajanlar bakımından yeterli koşulları sağlıyor olduğunu gösteriyor olmasına rağmen, viral etkenler bakımından herhangi bir garanti sağlamadığını göstermektedir. Ayrıca yüksek maliyetli virüs analizleri, halk sağlığı üzerinde doğrudan etkisi olan rutin kontrollerin yapılması için bir engel oluşturmaktadır. HACCP, GHP ve GMP gibi ilave önlemler, HAV ile bulaşmayı önlemek için kesinlikle çiftlikten çatala kadar uygulanmalıdır.

Anahtar kelimeler: Ahududu, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, hepatit A, koliform

Introduction

Viruses need live cells to replicate, and essentially intracellular living beings. Therefore, the amount of viruses neither increases during processing, transport and storage, nor causes any sensory changes in foods (21). All food-borne viruses are human patho-

gens (25). Food might be contaminated with feces, which may carry virus, bacteria or other health hazard organisms. Due to this idea food borne virus contamination usually thought to indicate fecal contamination of foods

Food-borne viruses are divided into three groups; viral gastroenteritis (Norovirus, Rotavirus and, Astrovirus), viral hepatitis (Hepatitis A and E) and other food-borne viruses (Enteroviruses) (24). Hepatitis A

Geliş Tarihi/Submission Date : 10.04.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 02.08.2018

*A part of this study was presented in "7th, Veterinary Food Hygiene Congress 04-08 Oct 2017, Aydın, Turkey" as an poster presentation

virus (HAV) belongs to the genus *Hepatovirus* of the *Picornaviridae* family. HAV is a positive sense virus that has a single helix RNA and it has a diameter of 27-32 nm and no membrane (4, 22, 24). HAV disinfectants are quite resilient to low pH, temperature and environmental conditions (22, 23).

Hepatitis A is generally transmitted through fecal or oral means, direct contact between people, or the intake of contaminated food and water (16, 22, 23). Food can be contaminated with HAV both during growing and later phases (27). Nearly 1.5 million hepatitis A cases occur worldwide each year (16). Marine crustaceans, fresh vegetables and fruits, salads, milk and, convenience food products that cause outbreaks most (1, 5, 23, 27, 28). Due to low infectious dose and long incubation period of the disease in food-borne hepatitis A outbreaks, the cause cannot be determined in 50% of the cases (3, 27). Contamination of foods usually is heterogynous, and the contaminating particle numbers are lower than the numbers in feces (2).

Such fruits as raspberries and strawberries are considered to be an important source of HAV contamination (10, 29). These fruits can be contaminated due to the usage of waste water during agricultural irrigation, fertilization or later processing stages conducted by infected personnel (8, 29, 30, 31). Hepatitis A outbreaks occur when these products are put on sale unpacked and touched with bare hands in markets. Additionally, they are not put through multi-phase washing processes so that their shelf-lives or sensory qualities are not affected (14). The risks posed by fruits are regarded as serious by European Union Prompt Alarm System. The records of the year 2013 alone reveal 13 cases, all of which report HAV contamination of grape-like plants (11). The studies conducted in Turkey are mostly seroprevalence studies, and studies regarding the presence of HAV in food products are very limited. This study can be accepted as the first report for HAV contamination and prevalence of frozen raspberries and it is first to represent possible link and correlation between fecal contamination and HAV contamination.

Material and Methods

In this study, samples of packaged frozen raspberry [*Rubusideaus*, (Ln.)], have been analyzed. 20 samples were obtained from local supermarkets monthly between January and December 2015 in Ankara province, Turkey. After the samples were obtained, they were brought to the laboratory and analyzed within 2 hours.

The HAV analysis of the raspberry samples in this study was performed according to ISO/TS 15216-1:2013 (20). *Mengovirus* was used for process control. All samples were analysed in two parallels. Enterobacteriaceae counting was performed according to ISO 21528-2 method (18), coliform bacteria counting ISO 4832 (19) and *Escherichia coli* counting ISO 16649-2 (17) methods. HAV analyzes were held after elution and concentration of virus particles and real time PCR was used to demonstrate the contamination. For this purpose the raspberry samples were mixed for 20 min with an equal volume of buffer containing 0.25 mol l⁻¹ Tris base and 1.92 mol l⁻¹ glycine (Sigma, St Louis, MO, USA), and the liquid was transferred to a centrifuge tube. The tubes were centrifuged at 9.000 g for 30 min at 4°C. The supernatants were transferred to another tube, and 0.05 volumes of 10 mg ml⁻¹ bovine serum albumin (Promega, Madison, WI, USA) and 0.1 volume of 5 mol l⁻¹ sodium chloride were added to each sample. The samples were mixed well by inversion. An equal volume of 17% polyethylene glycol (Sigma) was added to each sample, and the samples mixed by inversion and incubated overnight at 4°C. Following overnight incubation, the samples were centrifuged at 9.000 g for 30 min at 4°C, and the pellets were stored for further extraction.

After HAV recovery from samples, the viral pellet was dissolved in 1 ml of acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform mixture (Biotecx Laboratories Inc., Houston, TX, USA). Total RNA was precipitated from the aqueous phase by the addition of an equal volume of 100% isopropanol, washed with 75% ethanol and solubilized in RNase-free water. During RNA extraction, special care was taken to avoid cross-contamination by separating pre- and post-PCR work areas and using aerosol-resistant tips. Following conventional PCR, a NRT-PCR was performed using a set of internal primers, forward, reverse, and a TaqMan probe (FAM). The primer sequences are shown in table 1. The TaqMan probe, containing a 5' reporter dye and a downstream 3' quencher, hybridized to a specific sequence of the target HAV sequence amplified by the NRT-PCR. The amplification reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 1× PCR Master-mix (Applied Biosystems), 12.5 pmol of each primer, 15 pmol fluorescence-labelled probe, nuclease-free water and 2.5 µl of the conventional PCR product. The NRT-PCR assay was performed using SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). The following amplification protocol was used: 1 cycle at 95°C for 2 min, 50 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 40 s. Data analysis was performed using avai-

Table 1. Primer sequences used for detection of hepatitis A virus

Primers	5' to 3'
Forward	AGG CTA CGG GTG AAA CCT CTT AG
Reverse	CGC CGC TGT TAC CCT ATC C
TagMan Probe	AAT ACT TCT ATG AAG AGA TGC C

Table 2. Prevalence of HAV in frozen raspberries with contamination levels of *Enterobacteriaceae*, Coliform and *E. coli* in HAV positive samples (\log_{10} cfu/g \pm Sd)

Month	HAV (%) (P/T)*	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliform	<i>E. coli</i>
1	10 (2/20)	3.70 \pm 0.02	3.44 \pm 0.08	2.30 \pm 0.43
2	5 (1/20)	4.90	4.84	3.58
3	0 (0/20)	-	-	-
4	0 (0/20)	-	-	-
5	5 (1/20)	4.00	2.30	<10 ²
6	25 (5/20)	3.86 \pm 0.98	3.63 \pm 0.30	2.69 \pm 0.74
7	15 (3/20)	4.22 \pm 1.22	2.77 \pm 1.34	<10 ²
8	5 (1/20)	4.96	3.49	<10 ²
9	10 (2/20)	3.82 \pm 0.15	<10 ²	<10 ²
10	0 (0/20)	-	-	-
11	20 (4/20)	4.63 \pm 0.32	<10 ²	<10 ²
12	5 (1/20)	3.82	2.85	2.30

*Positive samples/Total samples

lable software (Applied Biosystems, 7500 Fast Real-Time PCR system Software). The cycle threshold (Ct) values were determined from the mean baseline signals during the early cycles of amplification. The amount of virus measured with NRT-PCR was determined using a standard curve.

Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* counts were held using Violet Red Bile Dextrose Agar, Violet Red Bile Lactose Agar, and Tryptone Bile X-glucuronide Agar (Merck, Darmstadt, Germany) respectively. For counting 25 g of raspberries were diluted using 225 ml peptone water and 0.1 mL of these dilutions were streaked on previously mentioned agars.

Results

Twenty (8.33%) of a total number of 240 raspberry samples were determined to be HAV-positive. While the highest prevalence (25%) was seen in the sixth month, HAV was not found in the samples that were taken in the third, fourth and tenth months. It was found that HAV contamination at eleventh month was 20%, 15% on seventh month, 10% on first and ninth months. Likewise on second, fifth, eighth and twelfth months it was 5%. At the same months *Enterobacteriaceae* was 4.90, 4.00, 4.96 and 3.82 \log_{10} cfu/g and coliform was 4.84, 2.30, 3.49 and 2.85 \log_{10} cfu/g. All HAV positive results were also positive for *Enterobacteriaceae*. However, on ninth and eleventh months no coliforms were found, together with HAV. Likewise, no *E. coli* contamination was accompanying to HAV on fifth, seventh, ninth and eleventh months. On ninth and eleventh months no *E. coli* contamination was recorded with HAV. In all HAV positive samples, highest *Enterobacteriaceae* contamination was recorded at 8th month (4.96 \log_{10} cfu/g), coliform (4.84 \log_{10} cfu/g) and *E. coli* (3.58 \log_{10} cfu/g) was on the second month. *E. coli* numbers were higher than regulation limit on first, second, sixth and twelfth months with the contamination levels of 2.30 \pm 0.43, 3.58, 2.69 \pm 0.74 and 2.30 \log_{10} cfu/g. The HAV prevalence in raspberries, the numbers of

Enterobacteriaceae, coliform and *E. coli* are shown in Table 2.

Discussion and Conclusion

While the studies on outbreaks due to hepatitis A in grape-like fruits mainly focus on determining the source of the outbreak and HAV incidence in humans (7, 12, 13, 15, 26), sufficient literature on hepatitis A prevalence in these products is lacking worldwide. Widespread consumption of the above-mentioned products without heat-treatment highlights the importance of viral contamination in these products. Also, it is known that HAV is not inactivated with freezing, a method of food preservation and the agent can survive freezing temperature for long periods (6). The fact that HAV was detected in this study shows that the agent can survive freezing conditions.

The fact that there is no control in any production stages to eliminate HAV and it is consumed directly is the reason why these products become the cause of frequent outbreaks (29). These products generally have acidic compositions (pH 2.5-3.3) and contain approximately 5% of sugar. HAV is more stable against heat-treatment in low pH and high sugar concentration (9, 10).

The data obtained in the present study show similarity with the studies (21,25) that report no bacterial indicators of fecal contamination in some of the products with HAV and no correlation between viral agents and bacterial agents. These food products pose a risk in terms of viral contamination even if they meet the required microbiological conditions (25).

In conclusion, the fact that food products meet the required microbiological conditions does not offer any guarantee in terms of viral agents, what is more, it is continuing to of importance in terms of public health as a result of the economic difficulties in applying analyses to routine. In order to eliminate the risk, it is necessary to focus on the areas where contamination

first occurs. The contaminations that may occur during and after processing need to be prevented by using such systems as HACCP, GHP and GMP efficiently. Also, care must be taken to prevent the risk posed by these products that are imported from endemic areas to the people in non-endemic areas. The imported products have to be checked with a fast and reliable method. Studies must be increased to build various chemical and physical barriers to minimize the contamination of grape-like fruits with HAV.

References

- Baert I, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods of inactivate food borne viruses. *Int J Food Microbiol* 2009; 131: 83-94.
- Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J Virol Methods* 2000; 88: 175-85.
- Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. Contamination of foods by food handlers: Experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (7): 2759-63.
- Blaise-Boisseau S, Hennechart-Colette C, Guiller L, Perelle S. Duplex real time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a processcontrol. *J Virol Methods* 2010; 166: 48-53.
- Butot S, Putallaz T, Amoroso R, Sanchez G. Inactivation on enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 4155-61.
- Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Effects on sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbes. *Int J Food Microbiol* 2008; 126: 30-5.
- Calder L, Simmons G, Thornley C, Taylor P, Pritchard K, Greening G, Bishop J. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 745-51.
- Croci L, de Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol* 2002; 73: 29-34.
- Deboosere N, Legeay O, Caudrelier Y, Lange M. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 73-85.
- Deboosere N, Pinon A, Delobel A, Temmam S, Morin T, Merle G, Blaise-Boisseau S, Perelle S, Vialette M. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of hepatitis A virus in acidified berries. *Food Microbiol* 2010; 27: 962-7.
- European Commission (RASFF Portal). Available at: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>. Accessed: 14.05.2016.
- Fitzgerald M, Thornton L, O'Gorman J, O'Connor L, Garvey P, Boland M, Part AM, Rogalska J, Coughlan H, MacDiarmada J, Heslin J, Canny M, Finnegan P, Moran J, O'Flanagan D; Hepatitis A Outbreak Control Team. Outbreak of hepatitis A infection associated with the consumption of frozen berries, Ireland, 2013- linked to an international outbreak. *Euro Surveill* 2014; 19(43): 20942.
- Gillesberg Lassen S, Soborg B, Midgley SE, Steen A, Vold L, Stene-Johansen K, Rimhanen-Finne R, Kontio M, Löfdahl M, Sundqvist L, Edelsein M, Jensen T, Vestergaard HT, Fischer TK, Molbak K, Ethelberg S. Ongoing multi-strain food-borne hepatitis A outbreak with frozen berries as suspected vehicle: four Nordic countries affected, October 2012 to April 2013. *Euro Surveill* 2013; 18(17): 20467.
- Huang Y, Chen H. A novel water-assisted pulsed light processing for decontamination of blueberries. *Food Microbiol* 2014; 40: 1-8.
- Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, Nainan OV, Weth J, Williams IT, Goldstein ST, Gensheimer KF, Bell BP, Saphiro CN, Alter MJ, Margolis HS. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. *N Eng J Med* 1999; 340(8): 595-602.
- Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Kawabata K, Kanayama A, Yahata Y, Takahashi T, Kinoshita H, Saitou T, Sunagawa T, Oishi K, Uema M, Noda M, Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a 2014 outbreak of hepatitis a in Japan. *Vaccine* 2015; 33: 6029-36.
- International Organization for Standardization (ISO) 16649-2: 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 2001
- International Organization for Standardization (ISO) 21528-2: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* -Part 2: Colony-count method. 2004
- International Organization for Standardization (ISO) 4832: 2006. Microbiology of food and ani-

- mal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique. 2006
20. International Organization for Standardization/ Turkish Standards (ISO/TS) 15216-1: 2013. Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-Part 1: Method for quantification. 2013.
 21. Koopmans M, Duizer E. Food borne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 23-41.
 22. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Food borne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 187-205.
 23. Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Gullier L, Perelle S. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiol* 2012; 31: 246-53.
 24. Morales-Rayas R, Wolffs PFG and Griffiths MW. *Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce*. *Int J Food Microbiol* 2010; 139: 48-55.
 25. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langehaar M, Threfall J, Scheutz F, van der Giessen J, Kruse HJ. Food-borne diseases- the challenges of 20 years ago stil persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* 2010; 139: 3-15.
 26. Nordic Outbreak Investigation Team. Joint analysis by the Nordic countries of hepatitis A outbreak, October 2012 to June 2013: frozen strawberries suspected. *Euro Surveill* 2013; 18 (17): 20520.
 27. Papafragkou E, Plante M, Mattison K, Bidawid S, Karthikeyan K, Farber JM, Jaykus LA. Rapid and sensitive detection of hepatitis A virus in representative food matrices. *J Virol Methods* 2008; 147: 177-87.
 28. Pebody RG, Leino T, Ruutu P, Kinnunen L, Davidkin I, Nohynek H, Leinikki P. Food borne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem?. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 55-9.
 29. Perrin A, Loutreul J, Boudaud N, Bertrand I, Gantzer C. Rapid, simple and efficient method for the detection on viral genomes on raspberries. *J Virol Methods* 2015; 224: 95-101.
 30. Reid TMS, Robinson HG. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol Infect* 1987; 98: 109-12.
 31. Rzezutka A, D'Agostino M, Cook N. An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. *Int J Food Microbiol* 2005; 108: 315-20.



Türkiye’de Hayvancılıkta İhmal Edilen Bir Disiplin: Çiftlik Hayvanlarına Değer Takdiri

Gülşen KESKİN

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Bölümü, Hatay-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Gülşen KESKİN; E-mail: gulsen.keskin@mku.edu.tr; ORCID: 0000-0001-2345-6789

Atıf yapmak için: Keskin G. Türkiye’de hayvancılıkta ihmal edilen bir disiplin: Çiftlik hayvanlarına değer takdiri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 49-54.

Özet: Türkiye’de tarımsal değer biçme denildiğinde; genellikle tarımsal taşınmazlara değer takdiri, kamulaştırma, toplulaştırma, sigorta kapsamındaki değerlendirmeler anlaşılmakta ve özellikle hayvancılık konusunda hiçbir çalışmaya rastlanmamaktadır. Oysa Türkiye’nin tarımsal üretiminin 2016 yılında %56’sı hayvansal üretimden kaynaklanmakta, canlı hayvanlar ise 89.8 milyar TL ile toplam tarımsal üretim değerinin %33’ünü oluşturmaktadır. Hayvancılık özellikle son yıllarda damızlık besi materyali ve et ithalatı ile fazlaca gündeme gelmekte, kurban bayramının yaklaştığı dönemlerde ise piyasada hareketlilik artmaktadır. Özellikle bu dönemlerde hayvancılıkta değerlendirme uzmanlığı özel bir önem taşımaktadır. Tarımsal varlıklara değer biçme ekonominin en eski disiplinlerinden birisi olmasına karşın araştırma ve öğretimde geri planda kalmıştır. Bu durum özellikle hayvancılık gibi özel alanlarda daha yoğun bir şekilde gerçekleşmiştir. Bunda tarımsal mallara değer biçmenin ekonomik teori ve metodların yanı sıra ilgili mevzuat bilgisi gibi alana yönelik birçok ilave bilgiye, tecrübeye ve disiplinler arası bir çalışmaya ihtiyaç duyması ve bu nedenle zor bir alan olarak görülmesi de etkili olmuştur. Bununla birlikte uluslararası muhasebe standartlarına uyum, tarımsal faaliyette bulunan işletmelerin/ şirketlerin borsalarda faaliyette bulunmaları gibi yeni uygulama alanlarının ortaya çıkması ile değerlendirme uzmanlığı önemi gittikçe artan bir alan olmuştur. Bu çalışmada hayvancılıkta değerlendirme amaç ve yöntemleri genel hatları ile anlatılmış ve Türkiye’de hayvancılıkta değerlendirme uygulamalarında en çok karşılaşılan durumlara dikkat çekilmiştir.

Anahtar kelimeler: Değer biçme, değerlendirme uygulamaları, değerlendirme yöntemleri, hayvancılıkta değer biçme

A Neglected Discipline in Livestock in Turkey: Appraisal to Farm Animals

Summary: When it is said agricultural appraisal in Turkey, it is generally understood as appraisal to agricultural premises and appraisals in the scope of expropriation, land consolidation and insurance and no studies can be seen especially in the subject of Livestock. However, 56% of Turkey’s agricultural production in 2016 results from livestock production and livestock establish 33% of the total agricultural production value with 89.8 billion TL. Livestock excessively comes to the agenda with breeding stock material and meat imports especially in recent years and in periods of sacrifice holiday, mobility in the market increases. Especially in these periods, appraisal expertise in livestock carries a special importance. Even though appraisal to agricultural assets is one of the oldest disciplines of the economy, it remained at the background in research and training. This condition has occurred especially in a more concentrated manner in special areas such as livestock. Besides economical theories and methods, appraisal to agricultural goods needs many additional information, experiences and disciplines like knowledge over the regulations and therefore it is seen as a difficult field and this has been effective in this condition to occur. Together with this, new application areas have appeared such as compliance to international accounting standards and enterprises/companies performing activities in the field of agriculture to perform activities in stock markets and appraisal expertise became a field with an increasing importance. In this study, the purposes and methods of appraisal in livestock has been told in its general lines and attention has been drawn to conditions which are mostly encountered in appraisal applications at cattle breeding in Turkey.

Key words: Appraisal, appraisal applications, appraisal in livestock, appraisal methods

Giriş

Türkiye’de tarımsal değer biçme kavramından genellikle tarım alanlarına değer biçme anlaşılmakta ve kamulaştırma, arazi toplulaştırması, zarar-ziyan ve tarımsal kredi amacı ile yapılan değerlendirmeler öne çıkmaktadır. Ekonomisi gelişmiş ülkelerde ise işletmelerin satılması, kiraya verilmesi, arazi alım-satımı,

miras veya karı-koca anlaşmazlığı, vergi, finansal kiralama, muhasebe, borsada işlem görme gibi farklı nedenlerle yapılan değer takdirleri de önemli olmaktadır.

Değer takdiri bir işletmenin piyasa/pazar işlemleri nedeniyle yapılabileceği gibi zarar ziyan oluşması gibi hukuki bir nedene dayalı olarak da yapılmaktadır. Hayvancılıkta değer takdiri alım satım, hastalık, salgın, yangın, elektrik kesintisi, bozuk ve uygun olma-

yan yem ve içerik, veteriner hizmetlerinden kaynaklanan ihmal ve zararlar, kazalar, ipotekler, icralar gibi çok farklı nedenlerle yapılmaktadır (11). Türkiye'de tarım işletmelerinin çoğunun küçük aile işletmelerinden oluşması nedeniyle uygulamalarda daha çok zarar ziyan, hastalık ve sigorta temelli olarak bir değer takdiri söz konusudur. Bunlara ilave olarak büyük işletmelerde muhasebe tekniği açısından da canlı envanter içerisinde önemli bir yeri olan iş ve irat hayvanları ile bunlardan elde edilen ürünlerin değerlendirilmesi ve hayvancılıkla ilgili envanterinde değerlendirme işlemlerinin yapılması gerekmektedir.

Türkiye'de özellikle hayvancılığın ağırlıklı olduğu, bu alanda ihtisaslaşmış işletmelerde hayvan sermayesinin payı nispeten yüksektir. Bu nedenle, özellikle bu işletmelerde hayvancılığa ait sermaye unsurlarının doğru değerlendirilmesinin önemi artmaktadır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde (GAP) küçükbaş hayvancılıkta ihtisaslaşmış işletmelerde yapılan bir çalışmada; hayvan sermayesinin aktif sermaye içinde % 9.8 ve işletme sermayesi içinde tüm işletme büyüklük gruplarında %46.7-78.7 arasında değişimle birlikte ortalama %60.1 pay aldığı görülmüştür (4). Türkiye'de hayvan sermayesi, tarım işletmelerinde muhasebe tutma zorunluluğu olmaması ve Avrupa Birliği'nde olduğu gibi bir Tarımsal Muhasebe Veri Ağı'nın oluşturulmaması nedeniyle piyasadan toplanan veriler ve çiftçi düzeyinde sahadan toplanan verilerin değerlendirilmesi ile belirlenebilmektedir (7). Bu kapsamda, özellikle ekonomik analiz çalışmalarında hayvan sermayesi, hayvanların verim ve yaş durumlarına göre, yöredeki alım satım fiyatları ve çiftçinin beyanı esas alınarak belirlenmektedir (4).

Tarımsal mallara değer takdiri ekonominin en eski disiplinlerinden birisi olmasına karşın araştırma ve öğretimde geri planda kalmıştır. Bunda özellikle çevre ekonomisi, planlama, işletme analizi gibi diğer alanlarda rekabetin öne çıkması etkili olmuştur. Ayrıca, tarımsal mallara değer biçme ekonomik teori ve metodların yanı sıra ilgili mevzuat bilgisi gibi alana yönelik birçok ilave bilgiye ve disipline de ihtiyaç duymakta ve bu nedenle zor bir alan olarak ifade edilmektedir. Uygulamalarda ise geniş bir kullanım alanı olması ve kişiler arasında ve kişi(ler) ve kurum(lar) arasındaki birçok durumda ortaya çıkan anlaşmazlıklarda, danışma ve/veya aracılık durumlarında da büyük bir öne-

me sahiptir (12).

Tüm diğer tarımsal varlıklarda olduğu gibi işletmede bulunan iş ve irat hayvanlarına da çeşitli amaçlarla değer takdiri yapılabilmektedir. Alım-satım, zarar tespiti gibi birçok alanda hayvanlara değer biçilmekle birlikte, en çok sigorta ve zararlar ile ilgili olarak irat hayvanlarının değeri takdir edilmektedir. Canlı hayvanlara değer takdirinde hayvan başına ve/veya grup olarak bir değer takdiri de söz konusu olmaktadır (3,11,14). Bunun yanı sıra erkek damızlıklar ve atlar gibi değeri yüksek olan hayvanların ise ayrı değerlendirilmesi gerekmektedir (11).

Bir taşınmaza veya ekonomik değeri olan bir mala değer biçilebilir için öncelikle değerlendirmeyi gerektiren bir olayın olması ve değerlendirme amacının buna göre belirlenmesi gerekmektedir. Daha sonraki aşamada ise değeri etkileyecek unsurların objektif olarak tespiti en önemli konu olmaktadır. Tüm bu değerlendirmeleri yapabilmek ve objektif bir değer biçme işlemi gerçekleştirebilmek, bu konuda yetmiş değerleme uzmanları ile yapılabilecektir. Bu nedenle şimdiye kadar ihmal edilmiş olan hayvancılıkta değerlendirme/değer biçme konusuna gereken önemin verilmesi ve özellikle üniversitelerde ilgili bölümlerde çalışmaların yapılması faydalı olacaktır. Bu çalışmada da genel olarak hayvancılıkta değer biçme yöntemleri ve uygulamaları anlatılarak konunun önemine dikkat çekilecektir.

Çiftlik hayvanlarına değer takdir yöntemleri

Ekonomik değeri olan bir mal veya hakka değer biçilebilir için öncelikle bu değerlendirmeyi gerektirecek bir olayın ortaya çıkması gerekmekte ve buna bağlı olarak da hangi amaçla değer takdiri yapılacağı belirlenmektedir (5). Çünkü bir mala biçilen değer, her zaman aynı olmayıp; zamana, duruma ve bakış açısına göre de değişebilmektedir. Bu nedenle, özellikle değer biçmenin amacı bilinmeden bir mala değer takdiri yapılamamakta ve yapılmış bir değer takdirinin sonuçları da o takdirin yapılmasındaki amaç bilinmeden doğru olarak yorumlanamamaktadır(15). Değer takdirini gerektiren önemli bazı nedenler ve değerlendirme amaçları Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre değer biçmenin çok geniş bir uygulama alanının olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Değerlendirmenin amacı ve konusu (5,12)

Olay	Değerlendirme Amacı	Değerlendirme Konusu
Satış	Alım-satım değeri	Pazar değeri
Miras ile devir	Miras veya hak sahibinin tazminat yüksekliğinin bulunması	Miras değeri/devir değeri
Boşanma /ortaklığın bozulması	Malların paylaşımı ve tanzimi için değerlendirme	Boşanma değeri / ortaklık payının değeri
Ortaklık ile malların birleşimi	Gelir dağılımı için değerlendirme	Fusion değeri
Kamulaştırma	Tazminatın yüksekliği	Kamulaştırma değeri
Kiralama yolu ile kullanımın devri	Kira bedelini belirleme	Kiralama değeri
İntifa hakkının devri	Kullanım değeri	İntifa değeri
Bir zararın oluşması	Zararı belirleme/sigorta değeri	Zararın değeri
Muhasebeleştirme	Muhasebe kaydı	Muhasebe değeri

Tablo 2. Çiftlik hayvanlarında farklı değer biçme yaklaşımları ve değerlendirme önerileri (11)

Değer Takdir Yaklaşımları	Değerlendirme Önerileri
1. Pazar Değeri	
*Satış değeri (karşılaştırma değeri)	*Pazar değeri yöntemi yeterli veri olması durumunda öncelikli olarak kullanılmalı, diğer yöntemler ise ancak yeterli veri olmaması durumunda kullanılmalıdır.
*Değer gelişim eğrisine yönlendirilme	*Yaş önemli bir değer belirleyici faktörse ve esas olarak yaş sınıflarına göre bir işlem söz konusu ise kullanılıyor.
*Farklı yaş gruplarının satış değerinin linear interpolasyonu	*Henüz ekonomik ömrünü tamamlamamış hayvanlarda basit bir değerlendirme isteniyorsa kullanılıyor.
2. Ekonomik Kullanım Değeri	
*Gelir değeri	*Normal kullanım süresi tamamlandığında bir tazminat değeri söz konusu ise kullanılıyor, bunun dışında ise değerlendirmelerde yardımcı unsurdur.
*Maliyet değeri	*Esas olarak geçmiş verilere dayalı olduğundan problemlidir, bunun dışında yardımcı değer olarak kullanılıyor.
*Tazminat değeri	
Satın alma değeri (mukayese değeri)	Benzer satış ve yeterli pazar verileri olduğunda öncelikli olarak kullanılıyor.
Net gelir değeri - brüt kar azalması	Üretim periyodunun tamamlanmasına yakın ortaya çıkan tazminat durumlarında kullanılıyor.
Maliyet değeri + brüt kar artışı	Üretim periyodunun başlangıcına yakın ortaya çıkan tazminat durumlarında kullanılıyor.
Yeni değer - değer azalması / hesaplanmış tazminat değeri	İşletmede çok yıllık tutulan hayvanlarda ve devam eden aynı tazminat durumlarında
- Net gelir değer farkı	Özellikle karmaşık zarar durumlarında kullanılıyor.

Hayvancılıkta değer takdiri esas olarak pazar değeri yöntemi ve ekonomik kullanım değeri olmak üzere Tablo 2'de görüldüğü gibi iki farklı değerlendirme yaklaşımına sahiptir. Örneğin; bir satış işleminde pazar değeri yöntemine göre değer, satış değerinden genellikle pazarlama masrafları düşülerek bulunurken, kullanım değeri ise satın alma değerine sigorta, taşıma gibi ilave masraflar eklenerek bulunabilmektedir (11). Kamulaştırmalar veya hayvan hastalıklarında olduğu gibi mevzuatta değerlendirmelerle ilgili hükümler yer alıyorsa mutlaka bunların da dikkate alınarak değer biçme işlemlerinin bu hükümlere uygun olarak yapılması gerekmektedir.

Hayvanların değer takdiri için gerekli olan veriler; işletmeye ait veriler, pazar verileri, istatistikler ve hesaplanan mukayese edilebilir veriler olmaktadır. Hayvanlara değer takdir yöntemleri genel olarak pazar değeri yöntemi, maliyet ve gelir yöntemi olarak sınıflandırılabilir. Tablo 2'de irat hayvanlarına değer takdiri yaklaşımı ve bunların kullanımı için bazı öneriler verilmektedir.

Genel olarak alım satımda grup veya tek başlarına hayvan değerleri bilirkişi vasıtasıyla belirlenmemekte, ancak işletmenin bir bütün olarak satışı söz konusu olduğunda envantere ayrı değerlendirilmesi gerektiğinden bir bilirkişi/uzman tarafından yapılması daha uygun görülmektedir (11).

Canlı hayvanlar için pazarda bir değer belirlenmiş veya alım satım oluşmuşsa bu değer karşılaştırmalarda kolayca kullanılabilir. Fiyatı belirlenmemiş fakat satılabilir olan gebe düve gibi hayvanlar için de değeri belirleyen faktörler dikkate alınarak karşılaştır-

ma yöntemi uygulanabilir. Ancak, genellikle piyasada yaygın işlem görmeyen henüz kesim olgunluğuna ulaşmamış hayvanlar, damızlık boğalar, ekonomik ömrünün ortasında bulunan süt hayvanları gibi canlı hayvanlar için bir piyasa fiyatı (mukayese değeri) belirlenemeyebilir (11). Bu durumda değer takdirinde öncelikle kıymeti belirleyen faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Değeri belirleyen faktörler ise her hayvan cinsinde ve aynı cins içinde ilerleyen özelliklerde de farklılık göstermektedir. Sığır besiciliğinde karlılığı ve kaliteli et üretimini etkileyen faktörler besiyeye alınan hayvanların ırkı, yaşı, cinsiyeti, kondisyonu, yapısı ve orijini. Ayrıca beside kullanılan yem ile sevk ve idarede etkili faktörler de bunlardan bazılarıdır (2,10,13,31). Değeri belirleyen en önemli kriterler besi ve kasaplık hayvanlarda ağırlık ve ticari sınıflandırmalar iken süt hayvanlarında ilk sırada ırk, ıslah durumu, menşee, dış görünüş, ağırlık ve gebeliğin evresi gelmektedir. Ayrıca süt verimi (miktar, yağ oranı, protein ve somatik hücre sayısı), yaş veya laktasyon sayısı, dış görünüş (tip, meme), menşee (işletmenin itibarı, annelerin üreme değeri), doğurganlık, buzağılama aralığı, sağım durumu (dakikadaki ortalama sağım), laktasyon durumu ve embriyo transferi gibi diğer faktörler de değeri etkilemektedir. Süt verimi ve ağırlık gibi nicel verilerin yanı sıra damızlık birlikleri tarafından kısmen nitel verilerin değerlendirilmesi için de tip ve meme puanı gibi nicel ölçü kriterleri de vardır (11). Bu verilerin kullanımı ise ancak mevcut olma durumlarına göre gerçekleşmektedir.

Verim ve değer arasındaki pozitif korelasyondan süt sığırıcılığında önemli teknik katsayılar; canlı ağırlık, günlük süt verimi, laktasyon süresi ve verimi, damız-

lık- kasaplık değer, ekonomik ömür, doğum ve ölüm oranı olarak özetlenebilir. Trakya Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada hayvanların canlı ağırlığı, günlük süt verimi, buzağı payı ve damızlık değer bakımından kültür ırkında; laktasyon süresi, kasaplık değer ve ekonomik ömür bakımından ise melez ırk hayvanlarda daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir (8). Buradan teknik katsayıların ırklara göre farklılık gösterdiği ve değerlendirmelerde dikkate alınması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca değerlendirmenin hangi amaçla yapılacağı da bu durumda önemli olmaktadır.

Türkiye'de uygulamaları

Hayvan değer kayıpları ve tazminatları: Türkiye'de hayvancılıkta değer biçme işlemleri çoğunlukla sigorta prim ve tazminatını belirlemek için yapılmaktadır. Sigorta amaçlı değerlendirmelerin dışında hayvan hastalıkları, tabii afetlerden zarar gören çiftçilere yönelik yardımlar ve çiftçi mallarının korunması kapsamında da değer biçme işlemleri yapılmaktadır. Bu değerlendirmeler; 5363 sayılı Tarım Sigortaları Kanunu, 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu, Tazminatlı Hayvan Hastalıkları ve Tazminat Oranlarına Dair Yönetmelik, Hayvan Hastalıkları Tazminat Yönetmeliği, 2090 sayılı Tabii Afetlerden Zarar Gören Çiftçilere Yapılacak Yardımlar Hakkındaki Kanun ve bu kanuna dayanarak çıkarılan yönetmelik ve 4081 sayılı Çifti Mallarının Korunması Hakkındaki Kanuna dayalı olarak yapılmaktadır (16,17,18,19,20,22,26). Ayrıca, uygulamaya yönelik olarak açıklanan Bakanlar Kurulu Kararları, sigorta genel şartları, talimat ve tarifelerin de dikkate alınması gerekmektedir (24,27,28).

Tarım sigortaları kanununa göre çiftlik hayvanları; büyükbaş ve küçükbaş hayvanları, kümes hayvanlarını ve kültür balıkçılığını ifade ederken, benzer şekilde 5996 sayılı kanunda; et, süt, yumurta dahil olmak üzere gıda, deri, kürk, yün, tüy veya diğer ürünlerin temini için veya işgücü amacıyla insanlar tarafından yetiştirilen ve beslenen hayvanları ifade etmektedir (19,20). 5363 sayılı kanunun 9. maddesine göre çiftlik hayvanları sigortalarının risk inceleme işlemleri veteriner hekimler ve zooteknist ziraat mühendisleri, hasar tespitleri ise veteriner hekimler tarafından yapılmaktadır. Aynı kanunun 12. maddesi ve 31 Aralık 2016 tarihli Bakanlar Kurulu Kararı ise teminat altına alınacak riskleri açıklamaktadır.

Çiftlik hayvanlarına sigorta amaçlı yapılan değer takdirlerinde sigorta yaptırılan risk ve bunun gerçekleşme durumu dikkate alınarak ve ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde değer biçilmektedir (27,28). Buna göre; sigorta edilmiş hayvanlarda meydana gelen hasarın nedeni, niteliği ve miktarı Tarım Sigortaları Havuzu veya Tarım Sigortaları Havuzu eksperlerinin belirlemelerine göre ve ancak taraflar arasında, mutabık kalınarak tespit edilmektedir. Tazminat hesapla-

maları ise poliçede yazılı olan hayvan birim fiyatına göre ve muafiyet, varsa müşterek sigorta ve sovtaj tutarları dikkate alınarak tarife ve talimatlarda belirtilen şekilde yapılmaktadır.

5996 sayılı kanunda hayvan hastalık tazminatının belirlenmesinde tazminatların işletmenin bulunduğu mahallin rayiç bedelleri dikkate alınarak yerel kıymet takdir komisyonu tarafından belirleneceği ifade edilmektedir. Bu kanuna dayanarak çıkarılan yönetmeliklerde ise kapsama alınan hastalıklar ve tazminat oranları açıklanarak tazminatın belirlenme esasları anlatılmaktadır (20,22,26).

Hayvan pazarları ve borsaları: Hayvan satış yerleri, 5996 sayılı kanunun ikinci bölümü 8. maddesinde yer almakta ve "hayvancılık işletmelerinden doğrudan yapılan satışlar hariç hayvanların alım ve satımları, ruhsatlı hayvan pazarı, borsalar ve Bakanlıktan izinli hayvan panayırlarında yapılır" denilmektedir. Aynı kanunun dördüncü bölümünde madde 11'de hayvan pazar ve borsalarının Bakanlıktan onay almak ve istenen kayıtları tutmakla yükümlü oldukları ifade edilmektedir. 5996 sayılı kanuna dayanarak hazırlanan yönetmeliklere göre; sorumlu yönetici veteriner hekim, hayvan satış yerine gelen ve satılan hayvanların miktar ve fiyatlarını, tür ve cinslerine göre kayıtlarını tutar veya tutturur. İşletmelerin tutması gereken kayıtlar ise satın alınan hayvanların pasaportları veya nakil belgeleri, sahibinin adı, menşei işletmesi, satın alma tarihi, kategorileri, sayısı ve tanımlama numarasıdır (21,23).

Hayvan fiyatları ile ilgili yapılacak fiyat araştırmalarında pazarda aynı nitelikte hayvan bulunamaması durumunda karşılaştırmalar için yakın nitelikteki hayvanların fiyatlarının araştırılması gerekmektedir (15). Bu nedenle hayvan pazar yerleri ve borsalarda tutulan kayıtlar ve verilerin tümü değerlendirmeler için önemli veri kaynaklarıdır ve özellikle anlaşmazlık durumlarında bilirkişilerin başvurabileceği önemli kaynak alanlardan birisidir. Hayvan pazar yerleri ve borsalar alıcı ve satıcının bir araya geldiği ve objektif değer oluştuğu önemli yerlerdir.

Türkiye muhasebe standartlarına göre değerlendirme: Uluslararası ticaretin artması sonucunda tarımsal faaliyetlerin muhasebeleştirilmesi daha da önem kazanmış ve International Accounting Standart Committee (IASC) tarafından hazırlanan International Accounting Standart 41 (IAS41) isimli standart 1 Ocak 2003 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Daha sonra Türkiye'de Sermaye Piyasası Kurulu (SPK), borsaya kayıtlı tarım işletmelerinin tarımsal faaliyetlerini düzenlemek amacıyla bir tebliğ yayınlamış ve Türkiye Muhasebe Standartları Kurumu (TMSK) 24.02.2006 tarihinde Tarımsal Faaliyet Standardını (TMS 41) yayınlamıştır (1,29,30).

Biyolojik dönüşüme sahip olmaları nedeniyle tarımsal

faaliyetler sonucu oluşan canlı varlık ve ürünlerin değerlendirilmesi önemli bir konudur. TMS41 Standardı ile tarımsal faaliyetlerde muhasebe standardı uluslararası muhasebe standartlarına uyumlu hale gelmiştir. Değerlendirmelerde ise esas olarak aktif piyasa fiyatları baz alınarak gerçeğe uygun bir değer yaklaşımını (piyasa fiyatı) benimsemiştir. Ancak, canlı varlığın veya ürünün aktif bir piyasası olmaması ya da gerçeğe uygun değerinin güvenilir olarak belirlenememesi durumunda yapılacak değerlendirmeler de TMS41 standardı tebliğinde açıklanmıştır. Buna göre aktif bir piyasanın olmaması veya gerçeğe uygun değerinin güvenilir olarak belirlenememesi durumunda maliyet ve gelir yöntemi ile emsal karşılaştırması yöntemi de kullanılabilir (6,25,29,30). Değerlendirmelerdeki en önemli konu ise hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın esas olanın değerlendirme ilke ve yöntemlerinin iyi bilinmesi olduğudur. Aranılan objektif değere en yakın sağlıklı bir değerlendirme ise ancak, hayvancılıkta değer biçme konusunda uzman kişiler tarafından yapılacak değerlendirmeler ile gerçekleştirilebilir (9).

Sonuç

Tüm tarımsal varlıklara değer takdirinde olduğu gibi hayvancılıkta da canlı hayvan veya hayvansal girdi ve çıktılara değer takdiri önemli çalışma alanlarından biridir. Genel bir ifade ile hayvancılıkta değer takdiri tüm tarımsal işletmenin veya hayvancılıkta ihtisaslaşmış bir işletmenin değerini belirlemek için gerekli olabileceği gibi sadece tek bir hayvanın veya sürünün/grubun değerlendirilmesinde de gerekebilir. Değerlendirme amaçları ise alım-satım, zarar-zıyan, vergi, muhasebeleştirme, kredi başvuruları ve anlaşmazlıklar gibi çok farklı nedenlerden/olaylardan kaynaklanabilmektedir. Değerlendirmeyi gerektiren olay değerlendirmenin amacını ve kullanılacak değerlendirme yöntemini belirlemekte ve genel olarak önemli değerlendirme yaklaşımları pazar değeri, maliyet değeri ve gelir değeri yaklaşımı olarak özetlenmektedir. Değerlendirmeyi yapan kişi bu yaklaşımlardan sadece birini kullanabildiği gibi duruma göre birkaçını birden kullanabilmektedir. Değerlendirmenin amacı ve kullanılan yöntem ne olursa olsun değerlendirmeyi yapanın mesleki bilgi ve tecrübesinin yanı sıra değerlendirme ilke ve yöntemleri ile konuyla ilgili mevzuatı da iyi bilmesi gerekmektedir. Ayrıca veri kaynaklarına ulaşım da sağlıklı, güvenilir bir değerlendirme için çok önemlidir.

Değer biçme işlemleri ilgili taraflara olduğu gibi ülke ekonomisine de doğrudan etki etmesine ve çok yaygın uygulama alanına rağmen konu üzerine üniversitelerde çalışan akademisyen azlığı ve bu konudaki araştırma ve yayınların eksikliği sahada bu konunun uygulamasını yapanları zorlamaktadır. Bununla birlikte özellikle tarımsal faaliyette bulunan bazı büyük işletmelerin borsalarda faaliyette bulunmaları da gelecek yıllarda bu konuda uzmanlaşmış eleman ihtiyacı-

nın artacağını göstermektedir. Türkiye'de tarımsal değer biçme denildiğinde genellikle tarımsal taşınmazlara değer takdiri, kamulaştırma, toplulaştırma ve sigorta kapsamındaki değerlendirmeler anlaşılmakta, özellikle hayvancılık konusunda hiçbir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu nedenlerle bu alandaki boşluğu doldurması açısından üniversitelerin ilgili bölümlerinde tarımsal değerlemeye önem verilmesi ve hayvancılıkta tarımsal değerlendirme uzmanlarının yetişmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Antepli A. Canlı varlıklarda maliyetlerin 7/b seçeneği ile izlenmesi ve uygulama örneği. PIBYD 2015; 2(1): 1-18.
2. Arpacık R. Sığır besiciliğinde karlılığı etkileyen başlıca faktörler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1978; 25(1): 183-90.
3. Bewertung Zoo- und Nutztieren, http://www.kommunale-verwaltung.sachsen.de/download/Kommunale_Verwaltung/Anlage_4_Zoo-_und_Nutztiere.pdf, Erişim tarihi: 10.04.2017.
4. Dellal İ, Keskin G, Dellal G. GAP Bölgesinde Küçükbaş Hayvan Yetiştiren İşletmelerin Ekonomik Analizi ve Hayvansal Ürünlerin Pazara Arzı. Ankara: Tepge Yayınları 83, 2002; ss. 7-40.
5. Gekle L. Leidfaden zur Lösung landwirtschaftlicher Bewertungsprobleme. Erste Auflage. Sankt Augustin: HLBS Verlag, 2002; pp. 1-40.
6. Gökgöz A. Tarımsal faaliyetlerde gerçeğe uygun değer tespiti ve muhasebeleştirilmesi. İşletme Araştırmaları Dergisi 2012; 4(4): 95-108.
7. Keskin G, Dellal İ. AB'de küçükbaş hayvan yetiştiren ihtisaslaşmış işletmeler ve Türkiye'nin uyum sürecindeki durumu. Yedinci Türkiye Tarım Ekonomisi Kongresi. Eylül, 13-15, 2006; Antalya-Türkiye.
8. Keskin G, Dellal İ. Trakya bölgesinde süt sığırcılığı üretim faaliyetinde brüt kar analizi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2011; 17(2): 177-82.
9. Keskin G. Ziraat mühendisi birlişiklerin eğitim gereksinimleri ve uygulamada karşılaştıkları sorunlara ilişkin bir araştırma. Harran Üniv Ziraat Fak Derg 2007; 11(3-4): 15-22.
10. Kor A, Karaca S, Ertuğrul M. Farklı barındırma sistemlerinin Akkeçi erkek oğlaklarında besi performansı, kesim ve karkas özelliklerine etkisi. Altıncı Zootekni Bilim Kongresi. Haziran, 24-26, 2009; Erzurum-Türkiye.
11. Köhne M. Landwirtschaftliche Taxationslehre.

- Zweite Auflage. Hamburg und Berlin: Verlag Paul Parey, 1993; pp. 20-99.
12. Köhne M. Landwirtschaftliche taxationslehre – Eine unterbewertete Disziplin-. Agrarwirtschaft 2006; 55(4): 173-4.
 13. Kutlu HR, Özen N. Hayvan beslemede son gelişmeler, Altıncı Zootekni Bilim Kongresi. Haziran, 24-26, 2009; Erzurum-Türkiye.
 14. Land- und Forstwirtschaft: Bewertung von Tieren, https://www.thueringen.de/imperia/md/content/nkftthueringen/schlussbericht/kapitel_3/03_anhang2.12_bmf14-11-2001.pdf, Erişim tarihi: 15.04.2017.
 15. Mülâyim ZG. Tarımsal Değer Bıçme ve Bilirkişilik. İkinci Genişletilmiş ve Yenilenmiş Baskı. Ankara: Yetkin Yayınevi, 2001; ss.10-250.
 16. Resmi Gazete. 4081 Sayılı Çiftçi Mallarının Korunması Hakkındaki Kanun. 10.07.1941 tarih ve 4856 sayılı Resmi Gazete.
 17. Resmi Gazete. 5488 Sayılı Tarım Kanunu. 25.04.2006 tarih ve 26149 sayılı Resmi Gazete.
 18. Resmi Gazete. 2090 Sayılı Tabii Afetlerden Zarar Gören Çiftçilere Yapılacak Yardımlar Hakkındaki Yönetmelik. 27.08.2006 tarih ve 26272 sayılı Resmi Gazete.
 19. Resmi Gazete. 5363 Sayılı Tarım Sigortaları Kanunu. 21.06.2005 tarih ve 25852 sayılı Resmi Gazete.
 20. Resmi Gazete. 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu. 13.06.2010 tarih ve 27610 sayılı Resmi Gazete.
 21. Resmi Gazete. Canlı Hayvan Ticareti Yapan Satıcıların Çalışma ve Denetlenmesi İle İlgili Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelik. 18.01.2012 tarih ve 28177 sayılı Resmi Gazete.
 22. Resmi Gazete. Hayvan Hastalıkları Tazminat Yönetmeliği. 06.03.2013 tarih ve 28579 sayılı Resmi Gazete.
 23. Resmi Gazete. Hayvan Satış Yerlerinin Ruhsatlandırılma ve Denetleme Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik. 12.2011 tarih ve 28152 sayılı Resmi Gazete.
 24. Resmi Gazete. Tarım Sigortaları Havuzu Tarafından Kapsama Alınacak Riskler, Ürünler ve Bölgeler ile Prim Desteği Oranlarına İlişkin Karar. 31.12.2016 tarih ve 29935 sayılı Resmi Gazete.
 25. Resmi Gazete. Tarımsal Faaliyetlere İlişkin Türkiye Muhasebe Standardı (TMS 41) Hakkında Tebliğ (Sıra No: 22). 24/2/2006 tarih ve 26090 sayılı Resmi Gazete.
 26. Resmi Gazete. Tazminatlı Hayvan Hastalıkları ve Tazminat Oranlarına Dair Yönetmelik. 14.01.2012 tarih ve 28173 sayılı Resmi Gazete.
 27. Tarım Sigortaları Havuzu (TARSİM), Devlet Destekli Hayvan Hayat Sigortası Genel Şartları 2017, <https://web.tarsim.gov.tr>, Erişim tarihi: 12.06.2017.
 28. Tarım Sigortaları Havuzu (TARSİM), Devlet Destekli Hayvan Hayat Sigortası Tarife ve Talimatlar 2017, <https://web.tarsim.gov.tr>, Erişim tarihi: 12.06.2017.
 29. Top T. Türkiye’de muhasebe standartlarına göre canlı varlıkların değerlemesi; büyükbaş hayvanlar üzerine bir uygulama, Yüksek lisans tezi, SDÜ Sos Bil Ens, Isparta 2009; ss.1-50.
 30. Tuğay O. Türkiye muhasebe standardı 41’e göre canlı varlıkların gerçeğe uygun değerinin tespiti ve muhasebeleştirilmesi. MAKÜ Sobed 2013; 5 (8):148-65.
 31. Uygur M. Sığırcılıkta besi performansını etkileyen faktörler. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Çiftçi Broşürü 138, <https://arastirma.tarim.gov.tr/etae/Belgeler/EgitimBrosur/138-ciftcibro.pdf>, Erişim tarihi: 10.05.2017.



Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Dilşad ONBAŞLI¹, Gökçen YUVALI ÇELİK¹, Sümeyye KAHRAMAN¹, Murat KANBUR²

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

²Erciyes Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Dilşad ONBAŞLI; E-mail: odilsad@gmail.com; ORCID: 0000-0002-0569-6989

Atıf yapmak için: Onbaşlı D, Yuvalı Çelik G, Kahraman S, Kanbur M. Apiterapi ve insan sağlığı üzerine etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 55-62.

Özet: Tüm kültürlerde insan sağlığı için geleneksel ve alternatif tıp uygulamaları kullanılmaktadır. Bu uygulamalardan biri de apiterapidir. Günümüzde hastalıkların tedavisinde kullanılan farmasötik ürünlerin meydana getirdikleri olumsuz etkiler, toksik olmayan, stabil, ucuz, yan ürünler üretmeyen, kolay bulunabilir ve elde edilebilir alternatif doğal tedavilere olan ihtiyacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Apiterapi, bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehri gibi arı ürünleriyle yapılan doğal bir tedavi yöntemidir. Başta bal olmak üzere arı ürünleri, yüzyıllardır halk arasında birçok hastalığın tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Bal, yaralarda inflamasyon ve ödemi azaltmaktadır. Oral olarak alınan balın immun sistemi aktive ettiği, kanser ve metastaza karşı koruyucu olduğu ve antimikrobiyal, antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Balın yanı sıra polen ve arı sütü de besin değerlerinin yüksekliği, içerdikleri protein, mineral, vitamin, serbest aminoasitler ve antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri nedeniyle apiterapide sıklıkla kullanılan ürünlerdir. Propolis birçok ilacın içeriğinde yer almaktadır. Antibakteriyel, antioksidan ve antikanser etkileri kanıtlanmıştır. Propolis-te bulunan krizin ve kampferol temel antialerjik bileşenlerdir. Arı zehri ise başta romatizma olmak üzere multiple skleroz (MS) ve romatoid artrit olgularında ayrıca egzama, epilepsi, migren gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada apiterapi ve bazı arı ürünleri hakkında bilgi verilmiş ve bu ürünlerin insan sağlığı üzerine etkileri derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Apiterapi, arı sütü, arı zehri, bal, polen, propolis

Apitherapy and Effect on Human Health

Summary: Some traditional and alternative medical implementations are used for human health in every culture. Apitherapy is one of those implementations. Today, the negative effects of pharmaceutical products used in the treatment of diseases have led to the need for alternative natural treatments that are not toxic, stable, cheap, do not produce by-products, are readily available and are obtainable. Apiterapi is a natural treatment method with bee products like honey, pollen, bee milk, propolis, bee poison. Bee products, primarily honey, have been used for centuries to treat many diseases among the public. Honey reduces inflammation and swelling in wounds. It is known that orally taken honey activates the immunity system, protects against cancer and metastasis, and has antimicrobial and antioxidant properties. In addition to honey, pollen and bee milk are frequently used products of apiterapide due to their high nutritional value, proteins, minerals, vitamins, free amino acids and antibacterial, antifungal and antioxidant properties. Propolis is found in many medicines. Antibacterial, antioxidant and anticancer effects have been proven. Caffeine and campherol are the major antiallergic components found in propolis. Bee venom is used in the treatment of many diseases such as rheumatism, multiple sclerosis (MS) and rheumatoid arthritis as well as eczema, epilepsy and migraine. In this study, information about apitherapy and some bee products were given and the effects of these products on human health were compiled.

Key words: Apitherapy, bee venom, honey, pollen, propolis, royal jelly

Giriş

Apiterapi; sağlığı korumak, hastalığı önlemek ve iyileştirmek amacıyla bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehri gibi arı ürünlerinin destek ve tedavi amacıyla kullanılmasıdır (15). Bal arılarının yeryüzünde yüzyıllardır var oluşu ve önemi, onların ürettiği bal, polen, propolis, arı sütü ve arı zehri gibi spesifik ürünlerin kimyasal yapısı, biyolojik özellikleri, bu arı ürünlerinin pek çok alanda uygulanabilirliği ve günümüzde de hala tıp alanında alternatif ürün olarak kullanılması

nedenyledir (48). Geleneksel hekimlikte yaygın olarak kullanılan bu arı ürünlerinin içeriği, toplandığı bölge ve bitki türüne bağlı olarak değişmesi, sentetik üretiminin olmaması, standardizasyon problemleri ve buna bağlı olarak patent sorunu gibi sebeplerden dolayı modern tıpta ve ilaç firmaları tarafından pek tercih edilmemiştir. Ancak son yıllarda sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve bu hastalık etmenlerinin ilaçlara karşı dayanıklı hale gelmesi sonucu insanlar yeniden doğal ilaçlara eğilim göstermişlerdir. Bu yönüyle arı ürünleri tıbbın destekçisi olarak önem kazanmıştır. Arı ürünlerini oluşturan bal, polen, arı sütü, propolis ve arı zehri insan sağlığı açısından

önemli ürünlerdir. Yapılan araştırmalarda bu ürünlerin antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, immünomodülatör etkileri, araştırmacıları apiterapiye yöneltirken, bu ürünlerin her geçen gün alternatif tıpta kullanım alanlarının geliştirilmesine de katkıda bulunmaktadır (15,16). Geleneksel ve alternatif tıptaki kullanımının yanında, arı ürünlerinin etkinliği ve yararları birçok laboratuvar testinde, hayvan deneylerinde ve hatta klinik çalışmalarda bildirilmiştir. Arı poleni enerji ve dayanıklılığı artırmak, propolis sağlıklı olma durumunu sürdürmek, arı sütü bağışıklık sistemini desteklemek ve enerjiyi artırmak amacıyla tüketilirken, bal yanıkları, yaraları, boğaz ağrılarını tedavi etmek amacıyla ve bir antiseptik olarak kullanılmaktadır (48). Arı zehiri, ağrının hafifletilmesi ve kronik inflamatuvar hastalıklarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (41). Bu derlemede, apiterapi ve insan sağlığı üzerine etkilerinin özetlenmesi ve farklı hastalıklardaki kullanımları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Bal

Bal; bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal bir üründür (61). Bal tarihte uzun zamandır bir besin olma yanında şifalı özelliğiyle de ilaç gibi kullanılmaktadır. İnsanlar tarafından ilk üretimi M.Ö. 4000'li yıllarda gerçekleştirilmiş olan bal insan beslenmesi ve sağlığı açısından her zaman önemli bir ürün olmuştur (16). Bileşimi toplandığı bitki florasına bağlı olarak değişim göstermekle birlikte kuru ağırlığının yaklaşık %95'i şekerlerden oluşmuş olup geri kalanı fenolik maddeler, proteinler ve minerallerden oluşmaktadır (10). Bal bakteri, virüs, mantar ve parazitlere karşı inhibe edici özelliklere sahiptir (15). Karadal ve Yıldırım (30) yaptıkları bir çalışmada hidatik kiste (ekinokokkoz) sebep olan *Echinococcus granulosus* parazitine uygulanan %10'luk bal konsantrasyonun üçüncü dakikadan itibaren öldürücü etki gösterdiği tespit etmişlerdir. Aksoy ve Diğerak (2) Bingöl yöresinden toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiş ve 0.1 mL bal örneğinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteri türleri ile *Candida albicans* ve *Rhodotorula rubra* gibi mantar türlerinin gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Balın antibakteriyel özelliği fenolik bileşiklerden başka onun osmotik yapısından ve yapısında bulunan glukoz oksidaz enzimi tarafından oluşturulan hidrojen peroksit (H₂O₂)'ten ileri gelmektedir (66). Viuda-Martos ve ark. (63) pinosebrin, galangin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) gibi flavanoidlerin bakteriyel RNA polimerazı engellediğini ve kuersetinin ise, hücre zarı geçirgenliğini artırarak bakterinin ATP sentezi, hücre zarından madde taşınması ve

hareketlilik yeteneğini kaybetmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Alvarez-Suarez ve ark. (3) balın antimikrobiyal etkinliğine karşı en hassas mikroorganizmanın *S. aureus* olduğunu, diğer taraftan *E. coli*'nin kısmen hassas olduğunu ve *P. aeruginosa*'nın ise en dirençli bakteri türü olduğunu göstermişlerdir. Genel olarak, gram pozitif bakterilerin balın antimikrobiyal etkisine, gram negatif bakterilerinden daha hassas olduklarını rapor etmişlerdir. Bal, doğal olarak antioksidan özelliği de olan bir besindir. Balın antioksidan özelliği yapısında bulunan glikoz oksidaz, katalaz, peroksidad gibi enzimlerin yanı sıra flavonoidler, fenolik asitler (benzoik, ferulik, kumarik ve kafeik asit) (33) karotenoidler, tokoferoller ve tiamin, riboflavin ve askorbik asit gibi vitaminlerden kaynaklanmaktadır (27). Özcan ve Olmez (47) Anadolu'nun çeşitli bölgelerinden 2006-2007 yılları arasında toplanan 16 bal örneğini inceledikleri bir araştırmada; mavi kantaron, sedir, çam ve fiğ balı gibi koyu renkli balların antioksidan kapasitelerinin açık renkli ballara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Islam ve ark. (28) Bangladeş balları üzerinde yaptıkları bir çalışmada toplanan farklı bal örneklerinin renkleri ve prolin aminoasidi içeriğinin, antioksidan kapasitesinin göstergesi olduğunu ve multiflora bal örneklerinin antioksidan kapasitesinin içerdiği fenolik asit ve flavonoid çeşit ve miktarlarına bağlı olarak monoflora bal örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit etmişlerdir. Balın kanser önleyici etkisi aralarında meme kanseri, rahim ağzı kanseri, lösemi, böbrek hücreli kanser, mesane kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, ağız kanseri, kemik kanseri ve beyin kanseri gibi çeşitli tümör hücrelerinde gözlemlenmiştir (3). Flavanoidlerin antikanser etkisi, aralarında tümör nekroz faktör-alfanın (TNF- α) uyarılması, hücre çoğalmasının engellenmesi, apoptosinin uyarılması ve hücre döngüsünün engellenmesi gibi ROS aracılıklı sinyalleşme yolunu düzenleyen antioksidan etkinlik aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (48). Balda yaygın olarak bulunan flavonoidlerden biri olan kuersetinin, farklı tümör tiplerinde önemli bir antiproliferatif etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (3). Samarghandian ve ark. (51) balın prostat kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı önleyici etki gösterdiğini ve bu etkinin balın krisin (flavonoid) içeriğiyle ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Balın antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkilerinin yanında bileşiminde bulunan metabolitlerin yara iyileşme, sindirim sistemi üzerine kalp ve damar hastalıklarına karşı olumlu etkileri olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (3). Ajibola ve ark. (1) balın, mide ülserinin temel etkeni olan *Helicobacter pylori* bakterisinin gelişimini inhibe ederek, hastalığın etkisini azalttığını bildirmişlerdir. Zanini ve ark. (67) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise günlük diyetle bal ile beslenen deneklerin mide lezyonlarını azalttığını tespit etmişlerdir.

Polen

Polen; çiçekli bitkilerin üremek amacı ile oluşturdukları

rı biyoaktif yapılar olup, arıların beslenmesi, balların sınıflandırılması ve sağlık alanında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (6,20). Polenlerin protein, karbonhidrat, lipid, enzim, vitamin, aminoasit gibi bileşenlerin yanı sıra adrenalin ve noradrenalin gibi hormon niteliğindeki biyoaktif bileşenleri de içerdiği bildirilmiştir (31). Besin öğelerinin yanında fenolik bileşenler de içermektedir (11,64). Polenin antibakteriyel, antifungal ve antioksidan, antikanser özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (21,52,61). Arı poleni kanser tedavisinin olumsuz etkilerini azaltmada etkili bulunmuştur. İştahsızlık, mide bulantısı, saç dökülmesi, inflamasyon, akyuvar azlığı (lökeni) ve uykusuzluk gibi radyasyonun yan etkilerine olumlu etki ettiği belirtilmiştir (61). Polenin sindirim sistemi rahatsızlıklarında; kronik kolit, mide ülseri, kanaması, ishal ve kabızlıkta, kansızlığın tedavisinde, kolesterol, lipid ve trigliserid kontrolünde faydaları görülmektedir (16). Yıldız (65) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada polenin, karaciğer hastalıklarına karşı iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Polenin alerjik nitelikte olduğu bilinmesine karşın, yapılan araştırmalarda vücutta alerjik tepkimelere yol açan histamini azaltarak astım ve alerji semptomlarını hafiflettiği bildirilmektedir (39). Polen, sindirimi kolaylaştırıcı, hücre yenileyici, canlılık verici, iştah artırıcı, hemoglobini yükseltici, soğuk algınlığı, sinirsel ve ülser rahatsızlıklarında yaygın olarak kullanılmaktadır (39).

Arı sütü

Arı sütü ilk kez Huber adlı bilim adamı tarafından ortaya konan 1972 yılında 'Gelee Royale' olarak tanımlanan arı sütü genç işçi arıların kafasında bulunan bezimsi dokulardan (hypopharyngeal) salgılanmaktadır (37). Arı sütünün içerisinde başlıca bileşenler olarak; proteik bileşenler (serbest aminoasitler), karbonhidratlar (fruktoz, glikoz) lipidler (serbest yağ asitleri, doymamış yağ asidi olan trans-10-hidroksi-2-desenoik asit), vitaminler ve mineraller bulunur (50,69). Haddadin ve ark. (24) arı sütünün hafızayı güçlendirdiği, fiziksel performansı arttırdığı ve deri yenilenmesine yardımcı olduğu, kan damarlarını genişletici ve kan basıncını düşürücü, yorgunluk giderici, yangı giderici, antibakteriyel, antioksidan, anti-tümör, antialerjik, gelişme ve büyümeyi hızlandırıcı, hormonal düzenleyici, bağıışıklık sistemini uyarıcı etkisinin olduğu bildirilmiştir. Mercan ve ark. (40) yaptıkları bir çalışmada arı sütünün bazı bakteriler üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Arı sütünün yapısında bulunan 10-HDA'nın (10-Hidroksi-delta-2-dekanoik asit) bakteri ve küflere karşı antibakteriyel etkileri olduğu bildirilmiştir (49). Barker ve ark. (8) en önemli serbest yağ asidinin 10-HDA olduğunu ve sadece arı sütünde bulunduğunu açıklamışlardır. 10-HDA, *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus spp.*, *Bacillus subtilis* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı güçlü bir antibiyotik etki göstermektedir (29). Sver ve ark. (57) arı sütünün bağıışıklık sistemini uyardığını belirtmişlerdir. Arı sütü-

nün yapısında bulunan royalisin antibakteriyel bir proteindir (30). Silici ve ark. (53) sisplatinin neden olduğu oksidatif stresi önlemede arı sütünün koruyucu etkilerini ortaya koymak amacıyla yürüttükleri çalışmada yetişkin albino erkek fareleri sekiz gruba ayırmışlar ve sisplatin, arı sütü, arı sütü+sisplatin vermişlerdir. Arı sütünün sisplatinle birlikte verildiği gruplarda oksidatif stres parametrelerinin iyileştiğini, diğer biyokimyasal parametrelerin de tedavi öncesi etkilerinin arı sütüyle daha etkili olduğunu bildirmişler ve arı sütünün fareler üzerinde sisplatinin neden olduğu problemler üzerinde antioksidan etkiye sahip olduğunu açıklamışlardır. Kohguchi ve ark. (34) erkek tavşanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada ise arı sütünün testosteron seviyesi, sperm sayısı ve hareketliliğinde artışın olduğunu gözlemlemişlerdir. Arı sütünün tansiyon düşürücü, damar genişletici ve kolesterol düşürücü etkileri bulunmaktadır (13). Arı sütü her çeşit beyin hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunduğu gözlenmiştir (25). Nakaya ve ark. (44) arı sütünün meme kanserli hastalarda lenfositler tarafından immunoglobulin üretimini arttırdığı ve anti-kanser etkisi gösteren IgM ve IgG artışına yol açtığını tespit etmişlerdir. Tamura ve ark. (58), Orsolice ve ark. (46) yaptıkları araştırmalarda farelere tümör enjekte etmişler ve metastaz ve tümör gelişimini incelemişlerdir. Araştırmalar sonucunda arı sütünün oral yolla verilmesiyle, sistematik bir şekilde tümör gelişimini ve metastazın kontrol altına alındığını ifade etmişlerdir. Kadmiyum organizmada genotoksik zararlara yol açan yüksek derecede zehirleyici ağır bir metaldir. Çavuşoğlu ve ark. (14) albino fareler üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada kadmiyumun neden olduğu genotoksiteyi ve oksidatif stresi önlemede arı sütünün etkilerini araştırmışlar ve arı sütü ilave edilen gruplarda farelerde oluşan oksidatif strese ve kadmiyumun neden olduğu zehirlenmelere karşı arı sütünün koruyucu etki gösterdiğini ve bunun da arı sütününün antioksidan etkilerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Guo ve ark. (23) erkek farelerde yapmış oldukları çalışmada arı sütü peptidlerinin lipid peroksidasyonunu önlemede etkilerini ortaya koymaya çalışmışlar ve arı sütü hormonlarının farelerde lipid peroksidasyonu önlenmesinde önemli etkilerinin bulunduğunu açıklamışlardır. Azab ve ark. (5) yürüttükleri çalışmada radyasyona maruz bırakılmış erkek albino farelerde, arı sütünün oksidatif stres ve doku yaralanmalarındaki etkilerini ortaya koymaya çalışmışlar ve arı sütü verilen farelerde hematolojik, histolojik ve biyokimyasal iyileşmeler gözlendiğini ve bunun da arı sütününün antioksidan etkisinden ileri geldiğini açıklamışlardır.

Propolis

Propolis, bal arılarının bitki tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçineleri bal mumu ve tükürük salgıları ile karıştırarak elde ettikleri bir üründür (6). Propolis genel olarak %50 reçine, %30 bal mumu, %10 uçucu yağ, %5 polen ve %5 diğer organik bileşiklerden oluşmaktadır (26,55). Propolis, veterinerlik ve insan sağlığı-

ğıyla ilgili kullanımlarında büyük potansiyele sahip olan doğal bir üründür. Propolisin en önemli aktif bileşenleri arasında aromatik asitler, fenolik maddeler, özellikle flavonoidler (flavonlar, flavonoller, flavononlar) ve fenolik asit gibi bileşenler bulunmaktadır (9). Propolis ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (15). Duran ve ark. (17) ve Naito ve ark. (43) propolisin, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans* ve *Trichophyton mentagrophytes* türlerine karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu ve topikal olarak uygulandığında antiinflamatuar etkiye sahip olduğu bildirmektedirler. Viuda-Martos ve ark. (63) propolis ve onun türevlerinin, aralarında herpes simplex tip 1, herpes simplex tip 2, adenovirüs tip 2, veziküler stomatit virüsü ve poliovirüs tip 2 gibi farklı virüslerde DNA ve RNA'yı baskılayarak virüs yayılımını engelleme kapasitesinin olduğu göstermişlerdir. Krisin, akasetin ve apigenin gibi propolisde bulunan flavonoidlerin, latent enfeksiyon modellerinde HIV-1 etkinleşmesini engellediğini ve Galanginin, herpes simplex virüsü (HSV) ve Coxsackie B virüsüne karşı Kuersetinin HSV, sinsityal virüsü, poliovirüs ve Sindbis virüsüne karşı antiviral etkisini bildirmişlerdir. Bunun yanında Banskota ve ark. (7) propolisin HIV-1 çoğalmasını baskıladığını belirtmişlerdir. Kurek-Górecka ve ark. (38) kafeik asit fenetil ester (CAPE), kuersetin ve kamferol, HIV-1 integrasyonu baskılayarak HIV-1 virüsünün çoğalmasını durdurduğunu tespit etmişlerdir. Propolisin diğer bir özelliği de sakinleştirici etkiye sahip olmasıdır. AIDS hastaları için henüz deneme aşamasında olmasına rağmen, özellikle başta kafeik asit olmak üzere bazı bileşikler nedeniyle uçuklar, grip etmeni, bazı virüs türleri ile akciğer kanserine karşı etkili olduğu ifade edilmektedir (42). Kanser tedavisinde propolise gösterilen ilgi onun apoptosisi uyurabilme becerisinden dolayıdır (48). Propolis, hücre çoğalmasını veya apoptosisi uyardığı bilinen kafeik asit, kafeik fenil ester, artepillin C, kuersetin, naringenin, resveratrol, galangin ve jenistein gibi birçok fenolik madde içermektedir (40). Banskota ve ark. (7) ve Kurek-Górecka ve ark. (38) hayvan modelleriyle yaptıkları çalışmalarda, propolisde bulunan flavonoidlerin akciğer, ağız, cilt, yemek borusu, mide, kalın bağırsak, karaciğer, prostat ve meme kanserlerinin gelişimini engellediğini göstermişlerdir. Banskota ve ark. (7) propolisin insan hepatosellüler karsinom, insan akciğeri karsinomu, deri tümörleri üzerine sitotoksik bir etkisinin bulunduğunu da bildirilmişlerdir. Ayrıca propolisde bulunan diterpenoitler, 3-(2,2-dimetil-8-prenilbenzopiren-6-yl) propenoik asit, kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve artepillin C maddelerinin DNA parçalanmasını ve apoptosisin başlatılmasını uyurarak sitotoksik etki sergilediğini göstermişlerdir. Premratanachai ve Chanchao, (48) yaptıkları çalışmada kafeik asit, CAPE ve kuersetinin de kanser hücresi gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Sforcin, (54) propolisin ve bazı bileşenlerinin antitümör etkisinin, makrofaj aktivasyonunu arttırmak yoluyla bağışıklık sistemini düzenle-

mesi ile bağlantılı olduğu bulmuştur. Propolisin kimyasal analizi ile ilgili olarak Velikova ve ark. (62), tarafından yapılan bir çalışmada, Cezayir ve Türkiye propolisleri incelenmiş ve analizler sonunda diterpenik asitler bulunmuştur. Garcia-Viguera (22) İspanya'nın iki farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerini GC-MS ile analiz etmiş, analiz edilen örneklerde yüksek seviyede kafeik asit, ferulik asit ve onların türevleri ile düşük seviyede sinamik asit, kumarik asit ve onların esterlerini bulmuştur. Farklı orjine sahip propolis örneklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Eraslan ve ark. (18) yaptıkları bir çalışmada, sodyum fuloridle muamele edilen ratlarda bazı biyokimyasal parametreler üzerine propolisin etkileri değerlendirilmiş ve propolisin sodyum fuloridin sebep olduğu serbest radikaller üzerinde anti-radikal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Chirimbolo (12) tarafından yapılan başka bir çalışmada propolisin içeriğinde yer alan fenolik bir bileşik olan kafeik asitin alerjiye yol açan proteinlerin sentezini önleyerek antialerjik etki gösterdiğini bildirmiştir. Oner ve ark. (45) propolisin septik artrit üzerinde antibiyotik kadar etkili olduğunu bildirmişlerdir. Türkez ve ark. (60) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise propolis uygulamasının, deney hayvanlarında alüminyum bağıli genetik hasarı ve karaciğer toksisitesini önlediğini, bozulan karaciğer enzim düzeylerinin düzeltilebileceğini gözlemlemişlerdir. Propolisin genel anlamda ilaç olarak kullanımı yaygın olup, kardiyovasküler ve kan dolaşım sistemi (anaemia), solunum yolları enfeksiyonları, diş sağlığı, deri tedavileri (doku yenileme, ülser, egzama), yara tedavileri özellikle yanık yaralar (mycosis), müköz zar enfeksiyonları ve lezyonları, kanser tedavisi, bağışıklık sistemi tedavisi ve sağlığı, sindirim rahatsızlıkları alanlarındaki tedavileri kapsar (36). Propolisin kulak enfeksiyonları, bronşlar, astım ve solunum yolları iltihaplarının tedavisinde iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür. Propolisin ilaç gibi kullanılması ile mide ve onikiparmak bağırsığı ülserlerinde, romatizmal hastalıklarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Erdem (19), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, propolisin diş çürüğü oluşumunu başlangıç düzeyinde durdurabildiğini ve bu yönüyle diş çürüğünde ve korunmasında kullanılabileceğini belirtmiştir.

Arı zehri

Arı zehri, işçi arıların iğneleri ile bağlantılı olan iki salgı bezi tarafından üretilir. İşçi arı, kovan savunması ve besin arama işleri ile ilgilenmeye başladığında arı zehrinin üretimi en üst seviyeye ulaşır. Arı yaşlandıkça üretim azalır. Ana arının zehir üretimi ise tehlike durumlarında en yüksek seviyede olur çünkü diğer kraliçe arılarla olabilecek ani savaş ve mücadelelere hazır olmak durumundadır (16). Arı zehri, açık renkte, kokusuz, sıvı bir madde olup, keskin ve acı bir tada sahiptir. İçinde bulunan alarm feromonları nedeniyle aromatik özellik taşımaktadır. Zehir, toplanma esna-

sında kolayca buharlaşan bileşikler de içermektedir. Hava ile temas ettiğinde opak ya da gri-beyaz kristaller şeklinde çökelmektedir. Suda çözünebilir özelliktedir. Solüsyonları renksizdir (15). Arı ürünleri içerisinde en az kullanım alanı bulan ürün, arı zehridir. Arı zehrinin tedavi amaçlı kullanımına dair ilk yayınlar 1864'te yapılmıştır. Günümüzde ise dünya literatüründe 1500'den fazla çalışmada arı zehrinin, klinikte kullanımından bahseder (32). Arı zehri başta multiple skleroz (MS) ve romatoid artrit olgularında ve yine atopik bünyeli bireylerin desensitize edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca arı zehri gribal ve ortopedik hastalıkların tedavisinde, bunların yanında mafsal iltihabi, deri kanseri, egzama, radyasyondan kaynaklanan hasarı azaltmada, epilepsi, edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome-AIDS), damar tıkanıklığı, migren, sinüzit tedavisinde de kullanılmaktadır. Arı zehrinin asıl etkisini sağlayan toksinler, değişik sayıda aminoasit içeren peptidlerdir. Bunlardan melittin, farmakolojik ve fizyolojik olarak; antibakteriyel, antifungal, sinir sistemini düzenleyici, radyasyondan koruyucu etki göstermektedir (35). Bazı araştırmacılar tarafından, arı zehrinin antikanser etkinliğinin önemli bir mekanizması olan sitotoksik etkinin, melittin tarafından fosfolipaz A2 (PLA2) enziminin etkinleştirilmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir (48,56). Son ve ark. (56) tarafından yapılan bir çalışmada farelere arı zehrinin damar içi uygulanmasının akciğer metastazlarını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Mirshafiey ve ark. (41) arı zehrinin, siklooksijenaz-2 ekspresyonunu, pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 beta) üretimini ve prostaglandin E-2 (PGE-2) sentezini engellemesinden kaynaklanan antiinflamatuvar ve immünosüpresif etkileri nedeniyle, multiple skleroz (MS), romatizmal eklem iltihabı (romatoid artrit) ve bunların deneysel modellerini kapsayan inflamatuvar hastalıklarda yararlı etkileri olduğu bildirmişlerdir. Son ve ark. (56) arı zehrinin antiartrit etkisi hayvan modellerinde göstermişlerdir. Arı zehrinin sıçanlarda eklem iltihabını ve kemik değişimlerini engellediğini, eklem kıkırdağı aşınmasını ve interfa-langiyal eklem içinde inflamatuvar hücre toplanmasını baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu engelleyici ve baskılayıcı etkilerin, çeşitli inflamatuvar ve otoimmün hastalıkları tedavi etmede kullanılan kortizolün sentetik bir türevi olan prednizolon tarafından sağlanan etki ile benzerlik gösterdiği sonucuna varmışlardır. Arı zehrinin antiartrit etkisinin, COX-2 ve PLA2 ekspresyonundaki düşüş ve TNF- α , IL-1, IL-6, NO ve ROS seviyelerindeki azalma ile bağlantılı olduğunu ve bu etkisinin onun antiinflamatuvar faaliyeti ile ilgili olabileceği bildirilmişlerdir. Tekeoğlu ve ark. (59), arı zehrinin akupunktur tedavi yöntemi ile kullanılabilirliğini araştırmışlar ve özel tasarlanmış arı zehri toplama aracı kullanılarak ham arı zehri elde etmişlerdir. Elde edilen bu ham arı zehriden dengeli venom çözeltisi hazırlamışlar ve cilt çizme (pin-prick) allerji testi ve intradermal test uygulamışlardır. Sonuçta, bu çalış-

madan elde ettikleri arı zehrini, akupunktur amacı ile kullanılacak bir ürün haline getirmişlerdir.

Sonuç

Son yıllarda dünyada Apiterapi adı verilen arı ürünleri kullanımına dayalı tedavi yöntemleri her geçen gün artmaktadır. Günümüz tedavi yöntemlerinin mevcut sağlık sorunlarını gidermede yetersiz kalması ve yaşam kalitesini düşüren yan etkilere sahip olması nedeniyle arı ürünleri ile tedavi yöntemleri hızlı gelişme göstermiştir. Arı ürünlerinin kullanılması ile hastalıkların tedavisi olarak adlandırılan apiterapi önceleri uzak doğu ülkelerinde kullanılan bir tedavi yöntemiymişken günümüzde tüm dünya ülkeleri tarafından kabul görmüş ve bu tedavi yöntemlerinin kullanıldığı birçok apiterapi merkezi kurulmuştur. Türkiye'de apiterapi henüz çok yeni olup ülkemiz arıcılık için uygun iklim ve bitki örtüsüne sahip olduğu gibi bal ve diğer arı ürünleri konusunda büyük bir potansiyel taşımasına rağmen hala bir apiterapi merkezine sahip değildir. Bu nedenle, ülkemizde apiterapiye, insan sağlığı açısından etkili ve alternatif bir tedavi gözüyle bakılarak bu doğal ürünlerin üretimi, tüketimi ve tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı ile ilgili gelecekte daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekir.

Kaynaklar

1. Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger, KH. Nutraceu-tical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutr Metab* 2012; 9(61): 1-13.
2. Aksoy Z, Dığrak M. Bingöl yöresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. *Fırat Üniv Fen Müh Bilim Derg* 2006; 18(4): 471-8.
3. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Battino M. Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr Med Chem* 2013; 20(5): 621-38.
4. Azab KS, Bashandy M, Salem M, Ahmed O, Tawfik Z, Helal H. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male wister albino rats. *N Am J Med Sci* 2011; 3(6): 268-76.
5. Bakoğlu A, Kutlu MA, Bengü AŞ. Bingöl ilinde arıların yoğun olarak konakladıkları alanlarda üretilen ballarda bulunan polenlerin tespiti. *Türk Tar Doğ Bilim Derg* 2014; 1(3): 348-53.
6. Bankova V, Popova M, Bodganov S, Sabatini AG. Chemical composition of european propolis: Expected and unexpected results. *Z Naturforsch* 2002; 57(5-6): 530-3.

7. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15(7): 561-71.
8. Barker SA, Foster AB, Lamb DC. Identification of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly. *Nature* 1959; 183(4666): 996-7.
9. Benkovic V, Knezevic HA, Brozovic G, Knezevic F, Dikic D, Bevanda M, Basic I, Orsolich N. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on ehrlich ascites tumor in mice. *Biomed Pharmacother* 2007; 61(5): 292-7.
10. Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L. Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie* 2004; 35(1): 4-17.
11. Bonvehi SJ, Torrento SM, Lorente CE. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric Food Chem* 2001; 49(4): 1848-53.
12. Chirumbolo S. Propolis as anti-inflammatory and anti-allergic compounds: Which role for flavonoids? *Int Immunopharma* 2011; 11(9): 1386-7.
13. Cho YT. Studies on royal jelly and abnormal cholesterol and triglycerides. *Am Bee J* 1977; 117: 36-8.
14. Çavuşoğlu K, Yapar K, Yalçın E. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *J Med Food* 2009; 12(6): 1286-92.
15. Çelik K, Aşgun HF. 2016, Arılarla gelen sağlık "apiterapi", <http://apitherapy-project.eu/pdf/20160920/apitherapy-handbook-tr.pdf>, Erişim tarihi: 24.07.2017.
16. Doğaroğlu M. Modern Arıcılık Teknikleri. İstanbul: Anadolu Matbaa ve Ambalaj San Tic Ltd Şti 2008; s. 296.
17. Duran N, Koc A, Oksuz H, Tamer C, Akaydin Y, Kozlu T, Celik M. The protective role of topical propolis on experimental keratitis via nitric oxide levels in rabbits. *Mol Cell Biochem* 2006; 281(1-2): 153-61.
18. Eraslan G, Kanbur M, Silici S. Evaluation of propolis effects on biochemical parameters in rats treated with sodium fluoride. *Pesticide* 2007; 88(3): 273-83.
19. Erdem GB. Propolis'in diş çürüklüğü oluşumuna etkisinin sıçan dişlerinde araştırılması. *Tek Arı* 2002; 77: 27-8.
20. Erdoğan Y, Dodoloğlu A. Balarısı (*Apis mellifera* L.) kolonilerin yaşamında polenin önemi. *Uludağ Bee J* 2005; 5(2): 79-84.
21. Garcia M, Perez-arquillue C, Juan T, Juan MI, Herrera A. Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. *Food Sci Technol Int* 2001; 7(2): 155-8.
22. Garcia-Viguera C. Composition of propolis from two different Spanish region. *Z Naturforsch* 1992; 47(7-8): 634-7.
23. Guo H, Ekusa A, Iwai K, Yonekura M, Takahata Y, Morimatsu F. Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54(3): 191-5.
24. Haddadin SY, Haddadin J, Benguiar R. The effect of royal jelly on growth and shortchain acid production of probiotic bacteria and activity of bacterial procarcinogenic enzymes in rat faeces. *Pol J Food Nutr Sci* 2012; 62(4): 251-8.
25. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomed Res* 2007; 28(5): 261-6.
26. Hegazi AG. Medical importance of bee products. *Uludağ Bee J* 2012; 12(4): 136-46.
27. Isidorov V, Bagan R, Bakier S, Swiecicka I. Chemical composition and antimicrobial activity of polish herbhoneys. *Food Chem* 2015; 171: 84-8.
28. Islam A, Khalil I, Islam N, Moniruzzaman M, Motlib A, Sulaiman SA, Gan SH. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12(1): 177.
29. Karabağ K, Dinç H, Selçuk M. Arı sütünün insan sağlığı için önemi. *Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu*. Ekim, 21-22, 2010; Düzce-Türkiye.
30. Karadal F, Yıldırım Y. Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2012; 9(3): 197-209.
31. Karataş F, Şerbetçi Z. Arı polenlerindeki adrenalın ve noradrenalin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi. *Fırat Üniv Fen Müh Bilim Derg* 2008; 20(3): 419-22.
32. Kelle İ. Apiterapi. *Dicle Tıp Derg*, 2007; 34(4): 311-5.
33. Khalil MI, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam MA, Islam MN, Sulaiman SA, Gan

- SH. Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules* 2012; 17(9): 11199-215.
34. Kohguchi M, Inoue S, Ushio S, Kurimoto M. Effect of royal jelly diet on the testicular function of hamsters. *Food Sci Technol Res* 2004; 10: 420-3.
35. Korkmaz A. 2017, Anlaşılabilir arıcılık, https://samsun.tarim.gov.tr/Belgeler/Yayinlar/Kitaplarimiz/anlasilabilir_aricilik.pdf, Erişim tarihi: 10.07.2017
36. Krell, R. Value-added products from beekeeping. *Fao Agricul Ser Bull* 1996; 124(5): 157-62.
37. Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H, Natori S. Change in the expression of hypopharyngeal gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J Biochem* 1996; 119(2): 291-5.
38. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 2013; 19(1): 78-101.
39. Medeiros KCP, Figueiredo CA, Figueredo TB, Piuvezam MR. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 2008; 119(1): 41-6.
40. Mercan M, Yuksekdağ ZN, Yılmaz M, Celik G, Beyatlı Y. Çeşitli illerden toplanan arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. *Mellifera* 2002; 2(4): 22-5.
41. Mirshafie A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacol* 2007; 3(3): 353-61.
42. Münstedt K, Zygmunt M. Propolis-current and future medical uses. *Am Bee J* 2001; 141(7): 507-10.
43. Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, Ohara N. Anti-inflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytother Res* 2007; 21(5): 452-6.
44. Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yuki-yoshi A, Tachibana H, Yamada K. Effect of royal jelly on bisphe-nol a-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(1): 253-5.
45. Oner M, Kafadar IH, Guney A, Argun M. Effect of intraarticular propolis in an experimental septic arthritis model. *J Pediatr Orthop B* 2011; 20(1): 8-13.
46. Orsolich N, Terzic S, Sver L. Honey-bee products in prevention and therapy of murine transplantable tumours. *J Sci Food Agricul* 2005; 85(3): 363-70.
47. Ozcan MM, Olmez C. Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chem* 2014; 163: 212-8.
48. Premratanachai P, Chanchao C. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(5): 337-44.
49. Ramadan MF, Ghamdi AA. Bioactive compounds and health promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods* 2012; 4(1): 39-52.
50. Rembold H, Dietz A. Biologically active substances in royal jelly. *Vitam Horm* 1966; 23: 359-82.
51. Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S. Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Pharmacogn Mag* 2011; 7(25): 46-52.
52. Saric A, Balog T, Sobocanec S, Kusi, B, Sverko V, Rusak G, Likic S, Bubalo D, Pinto B, Reali D, Marotti T. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(3): 547-54.
53. Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol* 2011; 29(1): 127-32.
54. Sforcin JM. Propolis and the immune system: A review. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(1): 1-14.
55. Schmidt, JO. Bee product chemical composition and application. International Conference on Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy. May, 26-30, 1997; Tel Aviv- Israel.
56. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007; 115(2): 246-70.
57. Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1996; 19(1): 31-8.
58. Tamura T, Fujii A, Kubayama N. Effects of royal jelly on experimental transplantable tumours. *Proceeding of the XXXth International Congress on Apiculture*. 1985; Nagoya-Japan.
59. Tekeoğlu İ, Kaleli S, Akdoğan M. Apiterapi ve arı zehiri akupunktur. *Akupunktur* 2016; 4(2): 30-6.
60. Türkez H, Yousef MI, Geyikoglu F. Propolis pre-

- vents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (10): 2741-6.
61. Ulbricht C, Conquer J, Giese N, Khalsa KPS, Sklar J, Weissner W, Woods J. An evidence-based systematic review of bee pollen by the natural standard research collaboration. *J Dietary Suppl* 2009; 6(3): 290-312.
 62. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 2000; 151(1): 59-66.
 63. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73(9): 117-24.
 64. Yamaguchi I, Tsuji T. The detection of bioactive components of the powder of bee pollen. *Bull Tokyo Kasei Un* 2002; 42: 111-4.
 65. Yıldız O. Bir gıda maddesi olarak kestane polenin kimyasal bileşimi, biyoaktif özellikleri ve karaciğer hasarını önlemedeki rolü, Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniv Fen Bil Ens, Trabzon 2011; s. 152.
 66. White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochem Biophys Acta* 1963; 73(1): 57-70.
 67. Zanini S, Marzotto M, Giovinazzo F, Bassi C, Bellavite P. Effects of dietary components on cancer of the digestive system. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 55(13): 1870-85.



Kısraklarda Doğum Sonrası Metritisin Sebepleri ve Tedavisi

Yaşar AKAR

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Yaşar AKAR; E-mail: yasarakar@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0002-0205-493X

Atıf yapmak için: Akar Y. Kısraklarda doğum sonrası metritisin sebepleri ve tedavisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 63-65.

Özet: Kısraklarda doğum sonrası metritis görülme sıklığı düşüktür, fakat doğum sırası yaralanma ve yavru zarlarının atılamadığında ise artmaktadır. Postpartum metritis; genital bölgenin yaralanması, uterus durgunluğu ve yavru zarlarının atılamaması ile ilişkilidir. Yaygın olarak tespit edilen bakteriler; *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus zooepidemicus*, beta hemolitik streptokoklar ve stafilokoklardır. Tedavi; uterus yıkaması, oksitosin kullanımı, kontrollü egzersiz, damar içi sıvı verilmesi, geniş spektrumlu antibiyotik ve antiinflamatuvar kullanımını içermektedir. Bu derlemede, son literatürler ışığında kısraklarda doğum sonrası görülen metritisin sebepleri ve tedavisi değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: Kısrak, metritis, postpartum, sebep, tedavi

The Causes and Therapy of Postpartum Metritis in Mares

Summary: The incidence of postpartum metritis in foaling mares is low, but increases when birthing trauma and retained placenta occurs. Postpartum metritis was associated with genital tract trauma, uterine inertia and retained placenta. Commonly isolated bacteria include *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus zooepidemicus*, beta haemolytic *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. Treatment involves uterine lavage, oxytocin therapy, controlled exercise, intravenous fluids, broad spectrum antibiotics and anti-inflammatory medications. In this review, causes and treatment of postpartum metritis in mares were focused in light of recent articles in the literature.

Key words: Cause, mare, metritis, postpartum, therapy

Giriş

Metritis doğum sonrası 1-10. günler arasında nadiren görülen ve zaman zaman endometriumu, myometriumu veya perimetriumu etkileyen uterusun yanginsel hastalığıdır (6). Tedavisinin yapılmaması halinde involusyonda gecikme, sepsisemil toksemi, laminitis ve ölüm görülme olasılığı yüksektir (4,6,7,15). Bu duruma metritis-laminitis-sepsisemi kompleksi (16,17,22) veya toksik metritis'de (7,11) denilmektedir.

Sebepleri

Doğumun kirli çevre koşullarında olması, güç doğum neticesi genital organ yaralanmaları, yavru sularının hidropsu, abort, torsiyo uteri, prolapsus uteri, vulva dudaklarının tam kapanamaması, uterus atonisi, sağlıklı şartlarda doğuma müdahaleler, plasentitis ve yavru zarlarının atılamaması sonrası endometriumda hasar ve büyük çapta kontaminasyon oluşturur. Bu durum, uterusu bakteriyel enfeksiyonlar oluşturmaktadır (2,3,7,8,13-18,21,22). Uterusta oluşan yaralanmalar, kalan yavru zarlarının yıkınlanması ve aşırı loşi sıvısı, bakteri ve toksinlerin hızla çoğalmasına

yardım etmektedir (1,3,6,7,14). Uterus duvarının ince, gevşek ve kırılğan olması bakteri ve toksinlerin geçişine izin vermektedir (1,7,17). Özellikle uterus içeriğinin atılımı geciktiğinde veya normal uterus mukoza bariyeri hasar gördüğünde, bakteri ve toksinlerin kan dolaşımına karışması hızlanmaktadır (6,7). Sonuçta sepsisemi ve toksemi tablosu ortaya çıkmaktadır (7,17). Ayrıca ağır yapılı çekim atları daha yüksek oranda doğum sonrası metritis riski altında bulunmaktadır (4).

Uterus enfeksiyonu bakteri tipi ve miktarına bağlı olarak değişmektedir (7). En sık tespit edilen gram negatif bakteriler; *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Str. equi zooepidemicus*, beta hemolitik streptokok ve stafilokoklar bulunmaktadır (6-8,15,17,22). Gram pozitif bakterilerden *Bacteroides fragilis* dış genital organlarda yaygın olarak belirlenmektedir. Bu bakteri çiftleşme, pneumovagina veya vagina-serviks yaralanmaları yoluyla uterusu giriş yaparak yangı oluşturmaktadır (6,7,20). Tespit edilen en yaygın mantar etkeni *Aspergillus*'lardır (1,8).

Klinik belirtileri

Soluk mukoza zarları, iştahsızlık, depresyon, vaginal

akıntı (sıklıkla kırmızımsı kahverengi ve kokulu), ateş, karın ağrısı, süt veriminde azalma, kalp atımında ve solunum sayısında artış gibi belirtiler doğum sonrası 1-10 gün içinde görülmektedir (6-8,10,11,17,22). Özellikle doğum kanalında yaralanma ve nekroz bulunuyorsa, bol miktarda vaginal irinli sıvı görülmektedir. Vaginal nekroz ve yırtıklarda veya atılamayan yavru zarları varsa bazen tekrarlayan karın ıkmaları ortaya çıkmaktadır (6).

Erken tanı ve tedavisi yapılmazsa septisemi, endotoksemi ve laminitis şekillenir (1,7,15,17). Laminitis şekillenmesi halinde 1-5 gün içinde tırnakta sıcaklık ve nabız ile birlikte çift taraflı veya dört ayakta birden topallık gelişebilmektedir (6,16,17,22). Bunu kardiovasküler kollaps, şok ve ölüm takip etmektedir (17). Tırnağın düşmesi ve üçüncü phalanksın rotasyonu halinde ötenazi gerekebilir (6). Uterus; involusyonu kötü, genişlemiş, gevşek ve kötü kokulu çikolata renkli sıvı ile dolu olarak sarkık bir torba şeklindedir (7).

Tanı

Anamnez ve klinik belirtiler ile tanı konulabilir (1,6,17). Rektal muayenede; hamur kıvamında, kalınlaşmış, ağrılı, sınırları tespit edilemeyen, çok miktarda kokulu sıvı içeren ve atonik olan uterus tespit edilmektedir (6,8,11,17,19). Ultrasonografi muayenesinde; uterusu aşırı sıvı birikimi, yavru zarlarının varlığı, genişlemiş uterus, döküntü miktarına bağlı olarak farklı oranda ekojenite ve göze çarpan oranda kalınlaşmış endometrium katları görüntülenmektedir (6-8,17,22). Doğum kanalı elle muayene edilerek şişme, ezilme, hematoma, kanama, yırtılma, nekrotik doku ve yavru zarlarının varlığı yönünden muayene edilmektedir (1,6,8). Tam kan sayımı yapıldığında lökopeni (2000 hücre/ μ L) ve nötropeni belirlenmektedir (6-8,17,22). Nötropeni sıklıkla doğum sonrası 3-4. günlerde görülmektedir. Septik toksik metritisli kısraklarda tam nötropeni (<1500 nötrofil/ μ L) yaygın bir bulgudur. Doğum sonrası ilk dört gün içinde rektal vücut ısısının 38.5 °C'nin üzerinde olması erken tanı için önemli bir belirtidir (4,6,7). Uterus ve loşi sıvısı numunelerinde, mikrobiyolojik tanı ve tedavi için antibiyogram yapılması faydalıdır (6,7). Pozitif postpartum uterus kültürleri daima önemli klinik bir problemi göstermez, bu sebeple kültür sonuçları klinik bulguların ışığında değerlendirilmelidir (8). Ayakların palpasyonu ve yan taraftan radiografisinin alınması, laminitis tanısına yardım etmektedir (17,19).

Prognoz ve komplikasyonları

Metritisin şiddetine, süresine ve sekonder komplikasyonlara bağlı olarak değişir. Hızlı ve etkin tedavisi yapılırsa prognozu iyidir. Endotoksemi gelişimi ardından laminitis şekillenirse prognoz kötüleşir. Uterus involusyonunun gecikmesi, sık sık boylu boyunca yatma, laktasyon yetersizliği, endotoksemi, septisemi,

laminitis ve ölüm görülen komplikasyonlardır (7,22).

Tedavi

Bakteri ve döküntülerin uzaklaştırılması tedavinin ilk adımını oluşturur (6,9,11,17,22). Perineal bölgenin dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra ılık (40-42 °C) steril 3-6 litre serum fizyolojik veya sulandırılmış iyot solüsyonu (<%1) dezenfekte edilmiş bir burun-mide sondası ile uterus içine nazikçe verilir ve geri alınır. Uterus sıvısı temiz olana kadar yıkama işlemine devam edilmelidir (5,6,8,10,11,16,17). Rektal ve ultrasonografi bulgularına göre uterusun yıkanması günde 1-3 defa yapılır (7,16,18). Tedavinin etkinliği; rektal muayene, seri tam kan sayımı ve ultrasonografi ile takip edilmektedir (1,8,17,22) Uterus yıkansa bile, antibiyotiklerin uterus içi kullanımlarının etkinlikleri çelişkili bulunmaktadır (6,10). Oksitosin uygulamaları (10-20 IU kas içi, 6 saate bir) uterus içeriğinin boşaltılmasına yardım etmektedir (5-8,11,17,22). Tırnakta ağrı yoksa kontrollü egzersiz yaptırılmalı, ağrı varsa padokta dinlendirilmelidir (1,6,7).

Güç doğum geçiren ve yavru zarlarını atamayan kısraklarda erken tedaviye başlanmalıdır. Doğum için hijyenik bir ortam sağlanmalı ve gerekmedikçe doğuma yardım edilmemelidir (7). Enfeksiyonun kontrolü için sistemik antibiyotik kullanılmalıdır. Gentamisin (6.6 mg/kg, damar içi, 24 saatte bir defa), penisilin (22.000-44.000 IU, damar içi veya kas içi, 6 saatte bir defa), trimetoprim sulfat (15-30 mg/kg, ağızdan, 12 saatte bir defa) ve metronidazole (15-25 mg/kg, ağızdan, 12 saatte bir defa) gibi antibiyotiklerden biri kullanılmalıdır. Endotoksemi riski bulunuyorsa, polimiksin-B (1000-6000 U/kg, yavaş damar içi, 6-8 saatte bir defa) ve flunixin meglumine (0.25 mg/kg, damar içi, 8 saatte bir defa) verilebilmektedir (6,11,12,15,17,22). Her 48-72. saatte bir defa toplam kan sayımı yapılarak, endotokseminin ve tedavi sürecinin izlenmesinde yarar bulunmaktadır (7). Destekleyici olarak geniş spektrumlu sistemik antibiyotik kullanımı, anti-histaminikler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve damar içi sıvı tedavileri sürdürülmelidir (7-9,11,15,17,18).

Heparin tedavisi ve tırnak taban içi desteği erken laminitis etkilerini önlediğinden başlanmalıdır. Ayrıca asetilpromazin maleate (0.02-0.04 mg/kg, kas içi, 4-6 saatte bir defa) gibi damar genişleticiler de kullanılabilir (5,8,10,11,22). Rektal ve ultrasonografi muayenelerinde; uterus içi sıvının azalması, uterus hacminin küçülmesi ve tonusundaki artış uterusdaki normalleşmenin önemli göstergeleridir (7,11,16,19,22). Tüm gayretlere rağmen bazı kısraklarda toksemi veya geri dönüşümsüz laminitis ve tırnak kemiklerinin dönmesi sebebiyle ölüm şekillenebilir (9).

Sonuç

Sonuç olarak kısraklarda doğum sonrası metritis; genital organ yaralanmaları, doğumun kirli çevre ve

sağlıksız müdahalelerle gerçekleşmesi, abort, vulva dudaklarının tam kapanamaması, uterus atonisi, placentitis ve yavru zarlarının atılmaması sebep olmaktadır. Tanısının hızlı yapılıp, tedavisinde uterus yıkaması, oksitosin kullanımı, kontrollü egzersiz, damar içi sıvı verilmesi, geniş spektrumlu antibiyotik ve anti-inflamatuvar kullanımı yapıldığında başarılı sonuçlar alınmaktadır.

Kaynaklar

1. Akar Y, Yıldız H. Puerperal dönem sorunları. Kaymaz M. Fındık M. Rişvanlı A. Köker A. eds. In: Kısıraklarda Doğum ve Jinekoloji. Birinci Baskı. Malatya: Medipres Yayıncılık, 2015; ss. 217-43.
2. Akar Y. Causes and treatment of uterine prolapse and invagination of horn uterine in mares. FÜ Sağ Bil Derg 2013; 27(1): 57-60.
3. Akar Y. The causes and therapy of retained placenta in mares. FÜ Sağ Bil Derg 2012; 26 (2): 125-30.
4. Aoki T, Yamakawa K, Ishii M. Factors affecting the incidence of postpartum fever in heavy draft mares. J Equine Vet Sci 2014; 34: 719-21.
5. Blanchard TL, Varner D, Scrutchfield W. Management of dystocia in mares: retained placenta, metritis and laminitis. Comp Cont Educ Pract Vet 1990; 12: 563.
6. Blanchard TL. Postpartum metritis. McKinnon AO. Squires EL. Vaala WE. Varner DD. eds. In: Equine Reproduction. Second Edition, London: Blackwell, 2011; pp. 2530-3.
7. Cadario ME. Postpartum metritis. Carleton CL. ed. In: Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Equine Theriogenology. Second Edition, West Sussex: Willey-Blackwell, 2011; pp. 448-58.
8. Card C, Lopate C. Infectious diseases of the puerperal period. Youngquist RS. Threlfall WR. eds. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Second Edition, Philadelphia: Saunders, 2007; pp. 138-44.
9. England GCW. Other post-partum problems. England GCW. eds. In: Fertility and Obstetrics in the Horse. Third Edition, Oxford: Blackwell, 2005; pp. 178-83.
10. Frazer GS. Disorders of the reproductive tract. Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. eds. In: Equine Internal Medicine. Fourth Edition, Missouri: Elseviers, 2017; pp. 1217-364.
11. Frazer GS. Postpartum complications in the mare. Part 2: Fetal membrane retention and conditions of the gastrointestinal tract, bladder and vagina. Equine Vet Edu 2002; 14(5): 50-9.
12. Hackett ES, Orsini JA, Divers TJ. Equine emergency drugs: approximate dosages and adverse reactions. Orsini JA. Divers TJ. eds. In: Equine Emergencies Treatment and Procedures. Third Edition. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007; pp. 739-52.
13. Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in Thoroughbred mares. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2005; 52(9): 474-7.
14. Hurtgen JP. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. Theriogenology 2006; 66: 560-6.
15. Jackson PGG. Handbook of Veterinary Obstetrics, Second Edition, China: Saunders, 2004; pp. 209-31.
16. LeBlanc MM. Diseases affecting multiple sites. Colahan PT. Merritt AM. Moore JN. Mayhew IG. eds. In: Equine Medicine and Surgery. Fifth Edition, St Louis: Mosby 1999; pp. 1148-57.
17. Munroe G, Campbell M, Munroe Z, Hanks M. Female reproductive tract. Munroe G. Weese JS. eds. In: Equine Clinical Medicine, Surgery, and Reproduction. First Edition, London: Manson, 2011; pp. 242-325.
18. Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. Infertility in the mare. Noakes DE. Parkinson TJ. England GCW. eds. In: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, Eighth Edition, China: Saunders, 2001; 577-620.
19. Perkins NR, Frazer GS. Reproductive emergencies in the mare. Vet Clin N Am: Equine Pract 1994; 10: 643-70.
20. Ricketts SW, Mackintosh ME. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. J Reprod Fertil Suppl 1987; 35: 343-51.
21. Tibary A, Fite CL. Reproductive tract infections. Sellon DC. Long MT. eds. In: Equine Infectious Diseases. First Edition, St. Louis: Saunders, 2007; pp. 84-103.
22. Wilson DA. Clinical Veterinary Advisor: The Horse. First Edition. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012; pp.608-9.



Rotavirus Enfeksiyonunun Moleküler Patogenezi

Zeynep AKKUTAY YOLDAR, Feray ALKAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Dr. Zeynep AKKUTAY YOLDAR; E-mail: akkutay@ankara.edu.tr; ORCID: 0000-0002-1178-5347

Cite this article as: Akkutay Yoldar Z, Alkan F. Rotavirus enfeksiyonunun moleküler patogenezi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 66-73.

Özet: Rotaviruslar çocuklar ve birçok hayvan türünün yeni doğanlarında ishalin en önemli nedenlerindedir. Çevre şartlarında uzun süre değişmeden kalabilen virusun gıda ve su ile de yayılması mümkündür. Ağız yoluyla organizmaya giren virus; ince bağırsak epitellerinde çoğalarak saçılımını gerçekleştirir ve ishale yol açar. Virusun çoğalması ve viral patogeneze konularında yapılan araştırmalar virus ile mücadelede araştırmacılara ışık tutmaktadır. Bu derleme rotavirus enfeksiyonunun moleküler patogenezi hakkında genel bilgi verilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Patogeneze, replikasyon, rotavirus

Molecular Pathogenesis of Rotavirus Infection

Summary: Rotaviruses are the most important cause of diarrhea in children and newborns of many animal species. It is possible to spread the virus which can stay in a stable state for a long time under environmental conditions, with food and water. Virus that enters the organism through one's mouth; proliferates in the small intestine epithelium, and causes diarrhea. Studies on virus propagation and viral pathogenesis shed light on researchers in combating viruses. This review is intended to provide general information about the molecular pathogenesis of rotavirus infection.

Key words: Pathogenesis, replication, rotavirus

Giriş

Rotavirus ilk olarak virus morfolojisinin elektron mikroskop ile incelenmesinin ardından 1974 yılında reovirus benzeri viral antijen olarak tanımlanmış; ilerleyen dönemlerde uluslararası taksonomi komitesi tarafından (ICTV) rotavirus ismiyle reoviridae familyası içinde sınıflandırılmıştır. Rotavirus, 65-70 nm büyüklüğünde, 12 proteini kodlayan (6 yapısal protein VP1-4, VP6, VP7 ve 6 yapısal olmayan protein NSP1-6) 11 segmentli, çift iplikçikli RNA bir içeren bir virus olarak tanımlanmıştır (Şekil 1) (20,21). Farklı türlerde enfeksiyon oluşturan rotaviruslar VP6 kodlayan gen bölgesi analizine göre 9 farklı serogrup (A,B,C,D,E,F,G,H,I) olarak sınıflandırılır (22,53). Kedi ve köpeklerde tespit edilen rotaviruslar I serogrup olarak sınıflanmışlardır (53,61). Gerek çocuklarda ve gerekse birçok hayvan türünde enfeksiyona neden olan rotaviruslar sıklıkla Grup A rotaviruslardır. Enfeksiyonu takiben serotip spesifik nötralizan antikorların oluşumuna yol açan dış kapsit proteinleri olan VP4 ve VP7 kodlayan gen bölgelerinin dizinlerine göre Grup A rotaviruslar sırasıyla proteaz (P) ve glikoprotein (G) genotip olarak sınıflandırılmaktadır (52,53). Bugüne kadar kanatlılar ve memelilerde en azından 31 G ve 44 P genotip tanımlanmıştır (41-44,53). Grup A rotavirusları ise en az 27 G türünü ve 37 P tipi içermektedir (43). Virusun segmentli RNA yapısı reassortment nedeniyle mutasyonlara neden olabildiğinden, virusun

genomik diziliminin kolayca değişebilmesi ve farklı genomik/antijenik yapıda yeni saha viruslarının oluşumu mümkündür (18).

Rotavirusun replikasyon mekanizması, proteinlerinin fonksiyonları ve patogenezi ile ilgili araştırmalar ilgi çekicidir. Virusün yapısal özelliklerinin kryo-elektron mikroskopik analizleri ve çeşitli tekniklerle (RNA interferens) virus konakçı ilişkileri araştırılmaktadır (4,27). Rotavirus enfeksiyonunun patogenezinde hedef dokusu olarak sadece enterositler bilinmesine rağmen virusun kanda viremi dönemini geçirebildiği gösterilmiş ve akciğer, karaciğer, merkezi sinir sistemi gibi dokularda virus RNA'sı tespit edilebilmiştir (11,17,60).

1. Rotavirusun Yapısal Özellikleri

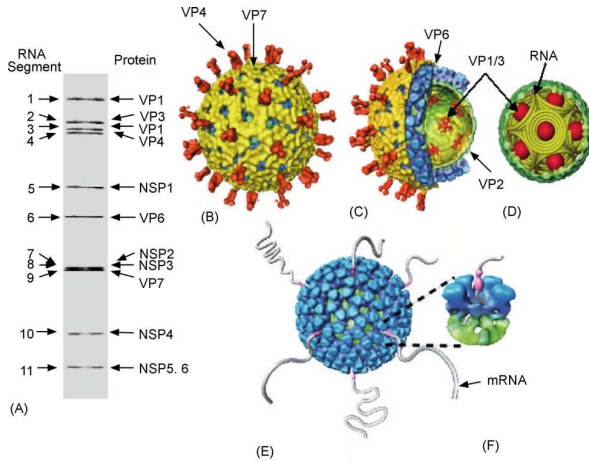
Rotavirus, Reoviridae ailesinde zarsız, ikozahedral, çift sarmal RNA (dsRNA) içeren bir virustur. Rotavirus kapsidinin işlevi bütün virus kapsidlerinde olduğu gibi genomunu korumak ve virus partikülünün kendi kopyalarını yapacağı uygun konakçıya aktararak, başarılı bir şekilde replike olmasını sağlamaktır (30).

Virus tarafından kodlanan farklı proteinlerin, kapsid sınırları içerisinde genomunu nasıl transkribe ettiği, infekte konakçı hücrenin sitoplazmasında rotaviral genlerin translasyonunu arttırmak için konakçı hücrenin translasyonunu nasıl kontrol ettiği, transkribe mRNA'yı şablon olarak kullanıp negatif sarmal sentezleyerek genom replikasyonunu sağlaması ve replike olmuş dsRNA genomunun paketlenmesi ve tam

virus partikülünün oluşturulması için kapsid tabakalarının toplanması gibi konular yapılan biyokimyasal çalışmalar sayesinde ortaya çıkmaya başlamıştır (30).

Konakçı hücrenin dsRNA'yı transkripsiyon gerçekleştirmesi amacıyla mRNA molekülüne çevirecek enzimatik mekanizmaya sahip olamaması nedeniyle, rotavirustaki dsRNA genom, kendi genomik çift sarmal RNA'larından mRNA molekülünü sağlayacak mekanizmaya sahiptir. Hücresel nükleazlar tarafından yapılan degradasyondan ve konakçı hücrede dsRNA'nın artmış konsantrasyonuna bağlı olarak tetiklenebilecek konakçı hücre antiviral cevabından korunmalıdır. Bu sebeple tüm dsRNA virusları transkripsiyon için kendi enzimlerini kodlar ve böylece kendi genomlarını endojenik olarak transkribe ederler. Endojen transkripsiyonun bu temel özelliği ve bu viruslardaki kapsid yapısı konakçıyla olan spesifik reaksiyonda önemli yer tutar (30,40).

Rotavirus genomu ikozahedral yapıya, üç katmanlı protein tabaka (Triple layered particle, TLP) tarafından korunur. Bu kalın protein (TLP) tabaka virusun bağırsakta bulunan asit ve sindirim enzimlerinin saldırısından korunmasını sağlar. Rotaviruslar özellikle şeker ve peptitleri parçalayıp sindirim sırasında onları dokulara ileten enterositleri (ileum villilerinin ucunda bulunan epitelium hücreleri) enfekte ederler. Virusun VP2'den yapılmış olan iç kapsit tabakası, genomik çift sarmal RNA'yı kuşatır. Özellikle VP2 katmanının



Şekil 1. Rotavirusun yapısal özellikleri

(A) Rotavirus genomunu oluşturan 11 dsRNA segmenti
 (B) Rotavirus üç katmanlı parçacığının (TLP) Cryo-EM rekonstrüksiyonu. Spike proteini VP4 ve en dış VP7 katmanı gösterilmiştir
 (C) İçte VP6, VP2 katmanlarını ve beş-yüzlü ekseninde VP2'ye bağlanan transkripsiyonel enzimleri gösteren rotavirus üç katmanlı parçacığının kesit görüntüsü
 (D) Rotavirusta genom organizasyonunun şematik tasviri (Genom segmentleri transkripsiyon enzimi VP2 katmanının içinde saran ters çevrilmiş konik spiraller olarak sunulmuş)
 (E ve F) Transkribe edilen çift-katmanlı parçacıkların (DLP) Cryo-EM rekonstrüksiyon modeli (30)

iç yüzeyi ile yakın ilişki içinde olan kısım, ikozahedral olarak düzenlenmiştir. VP2'nin iç yüzeyinde ikozahedral tepelere bağlanmış iki protein, VP1 ve VP3, tüm partikülün içinde genom transkripsiyonuna yol açar. Orta kapsit tabakası T=13 (levo) ikozahedral tel kafesi üzerine organize olan VP6 trimerinden oluşmuştur (Şekil 1) (21,22,30,45). Enfeksiyöz virusta en dış tabaka ana kapsit glikoproteini VP7 ve hemaglutinin spike proteini VP4'ten oluşmuştur. VP7 katmanının altında geniş ölçüde VP6 ile etkileşime giren VP4'e ait geniş globüler bir domain vardır (15,22).

2. Rotavirus Çoğalma ve Patogenezi

Rotavirus fekal oral yolla bulaşan, 100 virus partikülünden daha azının alınmasıyla dahi enfeksiyon oluşturabilen, tüm dünyada çocuklar ve birçok hayvan türünün yeni doğanlarında ishal meydana getiren enterik bir virustur (1,2,25,34). Rotavirus enfeksiyonu ishal, enterosit hasarından kaynaklanan malabsorpsiyon, enterik sinir sisteminin aktivasyonu ve epitelium hücre permeabilitesini ve klorid sekresyonunu değiştiren NSP4 viral proteininin faaliyeti gibi çeşitli mekanizmalarla sonuçlanır (32,55).

Rotavirus enfeksiyonu ince bağırsağın proksimal kısmında başlar ve distale yayılır. Genellikle en belirgin değişiklikler proksimal ince bağırsakta gözlenir (51). Rotavirus olgun enterositlerin villus uçlarında çoğalır (62). Enfeksiyon sonucu gelişen hücre ölümü villus epiteliumunun dökülmesine ve buna cevaben sekretorik kript hücrelerinin proliferasyonuna yol açar. Lümen içinde sıvı ve elektrolit kaybı artarken bağırsağın emilim kapasitesi düşer. Enterosit kaybı sonucunda sindirim enzimlerinin salınımı azalır ve bunu takiben karbonhidrat malabsorpsiyonu ve ishal gelişir. Ozmotik dengenin bozulmasından ileri gelen bu ishale ek olarak yapısal olmayan protein NSP4'ün hücresel iletim ve kalsiyum mobilizasyonunu etkilemesi de sekretorik ishale yol açar. Ayrıca NSP4 bazı prostaglandin ve bazı sitokinleri uyarak bağırsak sinir sistemini aktif hale geçirir ve sıvı sekresyonunu artırır (23,55).

Gittikçe sayısı artan raporlar, gastrointestinal sistemden kaçan rotavirusun çocuklarda antijenemiye, hayvan modellerinde de viremiye yol açtığını göstermiştir. Rotavirus antijeni ya da RNA'sı dokularda (karaciğer, akciğer, kalp, santral sinir sistemi) tespit edilmiştir (17,24,60). Rotaviruslar hücrenin sitoplazmasında çoğalırlar. Konakçı hücredeki replikasyon ve morfogenezlerini sağlamak için çeşitli yapısal olmayan proteinler kodlarlar. Virusun 11 dsRNA segmenti altı yapısal olmayan (NSP1-6) ve altı yapısal protein (VP1-4, VP6, VP7) kodlar. Yapısal proteinlerin isimlendirmeleri moleküler ağırlıkları baz alınarak konulur. En büyük VP1 125 kDa ağırlığındadır. İki proteolitik fragmenti olan VP4 ise en küçük ağırlığa sahiptir (28kDa) (49).

Yapısal proteinler çok katmanlı rotavirus partikülünü oluştururken, NSP1 dışındaki diğer yapısal olmayan proteinler virus replikasyonu için zorunludur. NSP1 ise interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3) ile etkileşime giren RNA'yı bağlayan proteindir (24). Hücre kültürlerinde NSP1'in yokluğu rotavirus replikasyonunu olumsuz yönde etkilememektedir. Bununla birlikte bazı hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda Type I interferon cevabına antagonist etki yaratarak viral patogeneze rol aldığı anlaşılmıştır (8). Virüslerin konakta hastalık oluşturma mekanizması olarak tanımlanan viral patogeneze etkenin organizmaya girişi, virüsün tipi, konakçı hücre ilişkileri, konağın cevabı gibi birçok bileşeni içerir. Bunların içinde en önemlilerinden biri de etkenin konağın çeşitli hücrelerinde başarılı bir şekilde üremesidir (16).

2.1. Virüsün hücreye girişi ve spike proteini VP4:

Rotaviruslar bağırsak epitel hücrelerini enfekte ederler. Virüsün en dış katmanı hücreye tutunma ve hücre içine virüsün girişinde rol oynar. Rotavirusun hücreye giriş mekanizmasında önceleri VP7 üzerinde durulmuş ise de daha sonra yapılan çalışmalar VP4'ün bu mekanizmada ana oyuncu olduğunu göstermiştir. VP7'nin VP4'ün hücreye giriş ve tutunmasında fonksiyonu bulunmaktadır (31). Glikoprotein VP7 virion yüzeyini kaplar ve VP4 proteinini yerine kilitlet (56). VP7, yapısal geçişleri düzenlemek için VP5 ile etkileşime girer (59). Hücreye girişteki ilk olay transkripsiyonel olarak aktif olan iki katmanlı partiküllerin (double-layered particle - DLP) sitoplazmada var olabilmesi için dış katman tabakasının kaybolmasıdır (39). Rotavirus dış kapsit proteini VP7 kalsiyuma bağlanır ve serbest kalsiyum iyonlarının (Ca_2^+) uzaklaştırılması, VP7 trimerlerini monomerlerine ayrıştırarak VP7 proteininde yapısal değişikliklerle yol açar. Böylelikle viriondan VP7 salınır ve VP4'te yapısal değişiklikler başlatır (3,31). VP4 ise hücreye tutunma ve penetrasyon yanısıra hemagglütinasyon, nötralizasyon ve virulansta da rol almaktadır. VP4'ün proteolitik ayrılması virus enfektivitesini birkaç kat arttırdığı gibi aynı zamanda virüsün hücreye girişini kolaylaştırır (16). Proteolizis sırasında VP4 (88 kDa), VP8 (28 kDa aa 1-247) ve VP5 (60 kDa, aa 248-776)'e ayrılır ve ayrılma ürünleri viriona birleşik bir şekilde kalır. Proteoliz rotavirusun hücreye girişinin etkinliğinde anahtar bir rol oynar. Rotavirusların proteaz yönünden zengin ince bağırsaklarda replike olması da bununla ilişkilidir (31).

Rotavirusun reseptörleriyle ilgili hipotez hala kanıtlanmadığından virüsün hücreye pinositoz ya da direk penetrasyonla girdiği tahmin edilmektedir. Birçok çalışma rotavirusun hücreye girişinin sialik asit içeren reseptörleri ve integrinleri de kapsayan kompleks bir işlem olduğunu göstermiştir (19). İntegrin hücre dışı matrikste bulunan fibronektin, kollajen ve fibrinojen gibi yapışma proteinlerindeki arjinin, glisin, aspartik asitten oluşan tripeptitlere bağlanan hücre zarındaki reseptör gruplarından biridir (33). Bu işlem sırasında

VP8 sialik asit ile etkileşime girerken, VP5'te integrinlerle ilişki içinde olur. Bazı rotavirus suşlarında VP8 proteini karbonhidrat bağlayıcı domain olarak düşünülmüştür. Bu domainin hücreye tutunmanın başlangıcında düzenleyici görevi gördüğü düşünülmüştür. VP4'ün alt birimi olan VP8, bağlanmada sialik asit (SA) içeren glikokonjugatı tanıyarak aracılık eder (19,62). Karbonhidrat tanıyan domain VP8'in sialik asit içeren konakçı hücre yüzey glikanlarına bağlandığı ve bunun ardından gelecek virus-hücre etkileşimlerinin sürdüğü düşünülmüştür (7,14).

2.2. Endojen transkripsiyon: Replikasyon siklusunda sırada gelen basamak dsRNA segmentleri şablon olarak kullanılarak, rotavirus proteinlerini üretecek mRNA molekülü transkripsiyonudur. Hücreye giriş sırasında dış katmanın uzaklaştırılması sonucuna sitoplazmada DLP olarak bulunan viral partiküller içinde dsRNA segmentleri transkribe edilirler. Transkripsiyon sırasında yeni oluşan ürünler DLP'nin içindeki VP2 ve dıştaki VP6 kapsid tabakalarının içine gömülmüş olan tip 1 kanal vasıtasıyla çıkarlar ve böylece DLP'nin yapısında bir değişiklik meydana gelmez (36).

DLP, mRNA transkriptlerini ve her bir mRNA'nın hücresel translasyon mekanizması tarafından kolayca translasyonu için gerekli olan 5'sonunun cap yapısının metillenmesi ve guanillenmesinde ihtiyaç duyulan bütün enzimatik aktiviteleri yapısında gerçekleştirebilmektedir (36). Bu enzimatik fonksiyonlar VP1, (RNA bağımlı RNA polimeraz) ve VP3 (guaniltransferaz ve metiltransferaz) tarafından gerçekleştirilir (49).

2.2.1. Endojen transkripsiyonda VP6'nın rolü: VP6 enzimatik fonksiyonlar yönünden eksik olmasına rağmen genomun endojen transkripsiyonunda zorunlu bir proteindir. Prasad ve ark. (50) tarafından çift katmanlı parçacıkların (DLP) ilk elektron mikroskopi çalışmaları VP6 katmanında fark edilen kanalların mRNA çıkışı için kullanılabileceği fikri ortaya atılmış; daha sonra aktif olarak transkripsiyon yapan DLP'lerle yapılan çalışmalar VP6 katmanında üç tip kanal olduğu gösterilmiştir. Yeni üretilmiş mRNA transkriptleri tip 1 kanallarından dışarı çıkar (36).

VP6 iki domaine sahiptir distal domain sekiz paralel sarmalla sandviç katı meydana getirir ve bununla VP7 katmanı ile ilişki kurar. Altaki domain ise bir heliks kümesinden oluşur ve içindeki VP2 katmanı ile iletişim kurar. VP6 katmanının tabanı baştan sona negatif elektrostatik potansiyel göstermesine karşılık VP6 ve VP2 arasındaki etkileşim ağırlıklı olarak hidrofobiktir. VP6 oldukça kararlı trimerler oluşturur. Bu sabit yapıyı sağlamak için yaptığı şeylerden biri de çinko iyonu bağı oluşturmaktır (31).

2.3. Genom replikasyonu ve paketlenmesi: Endojen transkripsiyonu ve transkriptlerin salınmasını takiben rotavirus replikasyon siklusunda birbirini takip eden üç ana basamak gözlenir. 1-Translasyon ve

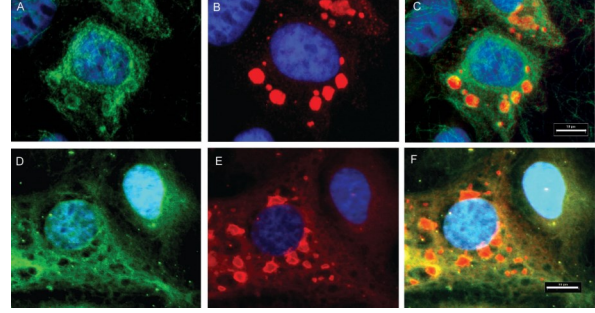
viral proteinlerin sentezi, 2-Replikasyon, genom paketlenmesi ve DLP toplanması, 3-Yeni oluşmuş DLPs'lerin (çift katmanlı parçacıklar) endoplazmik retikulumda tomurcuklanması dış katmanın olgun TLPs'leri (üç katmanlı parçacıklar) oluşturmak için toplanması (5,37).

2.4. NSP3 ve genom translasyonu: Rotavirus hücreye girdiğinde kendi mRNA'sını hücrenininki ile değiştirir. Normal RNA PABP adı verilen proteinle birlikte protein sentezini tetikleyen poly-A kuyruğuna sahiptir. Rotavirus bu proteinlere sahip değildir; bunun yerine NSP3 adı verilen farklı bir protein kullanır. Translasyonun başlangıcında rotaviruslar konakçı translasyon mekanizmasını ele geçirirler ve hücre protein sentezini keskin bir şekilde durdururlar. Rotavirus mRNA'sı poly(A) kuyruğuna sahip değildir ama onun yerine 3' ucunda viral yapısal olmayan NSP3 proteini tarafından bağlanan konsensus bir sekansa sahiptir. Bu sekans poly(A) bağlanma proteininin (PABP) yararlandığı bölgeleri kullanarak Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (eIF4G1) ile etkileşime girer. Hücresel mRNA translasyonu, ekspres edilen NSP3 tarafından inhibe edilir ve PABP'nin ve hücresel mRNA'ların kendilerinin hücre çekirdeğinde birikmesine yol açar (26,47,54).

Yapısal olmayan NSP3 proteini rotaviral mRNA'nın spesifik tanınmasında ve hücresel mekanizmayı kullanarak mRNA translasyonu kolaylaştırılmasında fonksiyon görür. NSP3 hücresel poly (A) bağlayan proteinin (PABP) fonksiyonel homologudur. NSP3 N-terminal domaini rotavirus mRNA'sının C-terminal konsensus sekansı ile etkileşime girerken mRNA'nın sirkülasyonunu ve onun viral protein sentezi için ribozoma taşınmasını sağlamak için C-terminal domainde eIF4G ile etkileşim halindedir. (49). RNA bağlayan domainler kalp şekilli asimetrik dimerler meydana getirirken C-terminal domaini çubuk şeklinde bir simetri meydana getirir. Dimerik N-terminal domaini mRNA'nın 3' konsensusuna sıkıca bağlanır. NSP3'ün bu bağlanması yeni yapılmış mRNA'ların replikasyonun hemen ardından viroplazmaya taşınması için de muhtemel bir mekanizma olabileceğini düşündürür (26, 49).

2.5. NSP2 ve NSP5: Reoviridae ailesindeki virüsler genom paketlenmesi, replikasyon ve erken seviye virion toplanmasına hizmet eden sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (viroplazmalar) üretirler (Şekil 2, A-F), (13). Rotavirus enfekte hücrelerde viroplazmaların çekirdeklenmesi iki yapısal olmayan proteine (NSP2 ve NSP5) bağlıdır (58), (Şekil 2, A-F). Bu yapısal olmayan proteinler sadece viroplazma oluşumunda değil aynı zamanda genom replikasyonu ve paketlenmesinde de görev alırlar (13). Enfekte olmayan hücrelerde NSP2 ve NSP5'in birlikte ifadesi viroplazma benzeri yapıları (VLP) oluşturur. NSP2 viroplazma oluşumunda, genom replikasyonu ve paketlenmesinde zorunlu bir proteindir (58). RNA-bağlama ve heliks

-destabilize etme özelliklerinin yanı sıra NSP2 nükleosit trifosfat aktivitesi sergiler. Bu enzimatik aktivite için korunmuş histidin (H225) katalitik rezidü olarak fonksiyon görür ve bu rezidünün mutasyonu viroplazm formasyonunu etkilemeden çift RNA sentezini ortadan kaldırır (35).



Şekil 2. Rotavirus enfekte hücrelerde mikrotübül ve viroplazmaların yerleşimlerinin floresan mikroskopi ile gösterilmesi **A:** Rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerin mikrotübülleri; **B:** Anti-NSP5 ile görülen rotavirus viroplazmaları; **C:** A ve B fotoğraflarının birleşimi; **D:** Rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerin mikrotübülleri; **E:** Anti-NSP2 ile görülen rotavirus viroplazmaları; **F:** D ve E fotoğraflarının birleştirilmesi (13)

Yapısal olmayan protein NSP5, Serin ve Threonin kalıntılarından zengin dimerik bir fosfoproteindir ve enfeksiyondan 2 saat sonra tespit edilebilir (10). NSP5'in görevi replikasyon ve paketlenme işlemi sırasında NSP2 ile bağlanmayı düzenlemektir. In vivo çalışmalarda da bu iki proteinin (NSP2 ve NSP5), yapısal proteinlerden VP1 (viral RNA polimerase), VP2 ve VP3 ile birlikte viroplazma içinde lokalize olduğu ve replikasyon araçlarının ana bileşenleri olduğu gösterilmiştir (8). NSP2 ve NSP5'in viroplazm oluşumuna, genom replikasyonuna ve virion toplanmasına katıldığına kanıt olarak siRNA teknikleri kullanılarak çalışmalar hem NSP2 hem de NSP5'in susturulmasının viroplazm oluşumunu, genom replikasyonunu ve viral toplanmayı inhibe ettiği göstermiştir (57).

NSP2 heliks destabilizasyonu gerçekleştiren NTPase, RTPase aktivitesiyle RNA bağlayan bir proteindir (28,31). Protein, yığılmış şekilde iki tetramerden meydana gelmiş halka şekilli, 35 Å genişliğinde bir çukur bulunan ve çörek şeklinde bir oktamerden oluşmuştur. Bu oktamerin kenarlarında bulunan oluklar RNA bağlayan kenarlar olması beklenen temel rezidülerle sınırlandırılmışlardır. Oktamer yüzeyinde yayılmış olan elektropozitif kanallar rekabetçi bir şekilde iki liganda bağlanır; ssRNA ve NSP5 (58). Böylece NTPaz aktivitesi monomerik alt üniteye yerleşeceği zaman RNA'ya ve oktamerin oluşumu için gerekli olan NSP5 ve VP1 gibi proteinlere bağlanma kabiliyetine sahip olur (30,31).

2.6. Rotavirus genomunun kapsit ile kuşatılması (kapsidasyon) modeli: Her bir virionda dsRNA'nın 11 segmentinin doğru bir şekilde enkapside edilmeli-

dir. dsRNA genomu segmentlerinin önceden oluşmuş boş kapsidlere yerleşiyor olması da makul bulunmaktadır. Bunun yerine enkapsidasyonun, kapsid toplanmasıyla (assembly) eş zamanlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir. + RNA'ların ve viral proteinlerin enkapsidasyon öncesi veya sırasında işlevleri tam bilinmiyor (46, 49). Kapsidin toplanması 12 birimin birleşmesiyle başlar. Bu birleşim SLP oluşumu ve peşi sıra gelecek VP6 toplanması iskelet yapısı için gereklidir ki bu toplanmada DLP toplanmasına öncülük eder (9). VP2'nin N-terminal bölgesi, VP1'in enkapsidasyonu için gereklidir (12).

2.7. Olgunlaşma ve salınım: Olgunlaşma ve salınım rotavirus replikasyon siklusunun son basamaklarıdır. İlk olarak DLP'ler proksimal olarak yerleşmiş endoplazmik retikulum tomurcuklanırlar ve mekanizması bilinmeyen bir şekilde çift katmanlı parçacıklar VP7 ve VP4'ü içeren en dış katmanı kazanırlar. Bu işlem sırasında geçici olarak zarlanmış bir partikül oluşur ve dış kapsid proteinleri bu partiküller üzerinde yerleşir. Olgun partiküller endoplazmik retikulum lümeninde toplanırlar (20). Bu tomurcuklanma işlemi VP6 proteini için bir bağlanma bölgesi bulunan yapısal olmayan protein NSP4 tarafından kolaylaştırılır. Hem VP4 hem de dış katman proteini VP7 endoplazmik retikulumla ilişkili ribozomlarda sentezlenir ve birlikte endoplazmik retikulum girerler.

NSP4 ağırlıklı olarak α -helikal bir glikoproteindir. Endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında C-terminalinin 131 terminal rezidüleriyle tetramer oluşturur. C-terminal rezidüleri VP6 için bir bağlanma kısmı oluştururlar ve DLP'ler için hücre içi bir reseptör görevi görür ve maturasyonda rol alır (48). NSP4'ün hücre içinde Ca^{2+} salınımında da fonksiyonu vardır (29). NSP4'ün bilinen asıl fonksiyonu ise viral enterotoksin vazifesi görüp diareyi indüklemesidir (6,37,38).

VP4 proteini bağımsız olarak sitoplazmik membranda yapılan bir proteindir. Fakat olgun virus partikülünün oluşabilmesi için VP7 katmanına eklenmelidir. VP7 proteini ise endoplazmik retikulumda toplanan bir proteindir. Farklı yerlerde toplanma aşamalarını (assembly) geçiren bu proteinlerin en dış katmanı oluşturmak için bir araya gelmektedir (4). Rotavirus parçacıkları endoplazmik retikulum içinde başlangıçta geçici olarak zarlıdır, fakat VP4 ve VP7'yi içeren dış tabakayı oluşturduğunda zarf kaybolur (22). VP4 proteini de nasıl meydana geldiği bilinmeyen bir şekilde üç katmanlı parçacıklara eklendikten sonra enfeksiyöz virus partikülü şekillenmiş olur ve virus farklılaşmış enterosit hücrelerinde apikal yüzeyden hücreyi terk eder. Virusun bilinen asıl salınımı hücreyi lize ederek dışarı çıkmasıdır (4).

Sonuç

Bugüne dek bildirilen yapısal ve biyokimyasal araştırmalar ile rotavirusun replikasyonu ve moleküler pato-

genezi hakkında birçok bilgi sağlanmış olup, halen konu hakkında araştırmalar devam etmektedir. Söz konusu bu araştırmalar; virus-hücre reseptör ilişkisi, NSP4'ün DLP ve TLP oluşumuna ne şekilde katkı sağladığı, VP4'ün olgunlaşma aşamasında virusa nasıl entegre olduğu, virusun generalize enfeksiyon meydana getirip getirmediği gibi konuları kapsamaktadır.

Ülkemizde rotavirus enfeksiyonlarının insanlar yanı sıra, farklı hayvanlardan izolasyonu gerçekleştirilmiştir (1,2). Hayvancılığın önemli yer tuttuğu Türkiye'de; ekonomik kayıplara yol açan rotavirus enfeksiyonlarının özellikle buzağılarda seyreden genotiplerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar; ileride geliştirilmesi düşünülen aşılarda için temel oluşturmaktadır (1,2). Ayrıca bu çalışmalarda kazanılan izolatlar, virusun patogenezi anlamaya yönelik çalışmalar yapmayı da mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda; yeni doğanlarda gastroenteritis ile seyreden rotavirus enfeksiyonları önemli bir sıklığa sahip olup; virusun moleküler düzeyde patogenezi aydınlatacak her çalışma nihai hedef olan bu enfeksiyondan korunma konusunda önemli verilerin sağlanması adına değerli çalışmalar olarak yer tutacaktır.

Kaynaklar

1. Alkan F, Gulyaz V, Timurkan MO, Iyisan S, Ozdemir S, Turan N, Buonavoglia C, Martella V. A large outbreak of enteritis in goat flocks in Marmara, Turkey, by G8P [1] group A rotaviruses. Arch Virol 2012; 157(6):1183-7.
2. Alkan F, Ozkul A, Oguzoglu TC, Timurkan MO, Caliskan E, Martella V, Burgu I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. Vet Microbiol 2010; 141(3): 231-7.
3. Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. Science 2009; 324(5933): 1444-7.
4. Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, López S. RNA silencing of rotavirus gene expression. Virus Res 2004; 102(1): 43-51.
5. Baker TS, Olson NH, Fuller SD. Adding the third dimension to virus life cycles: Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. Microbiol Mol Biol R 1999; 63(4): 862-922.
6. Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. Science 1996; 272 (5258): 101-4.

7. Banda K, Kang G, Varki A. 'Sialidase sensitivity' of rotaviruses revisited. *Nat Chem Biol* 2009; 5 (2): 71.
8. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *PNAS* 2005; 102(11): 4114-9.
9. Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 2003; 77(3): 1757-63.
10. Blackhall J, Munoz M, Fuentes A, Magnusson G. Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* 1998; 72(8): 6398-405.
11. Blutt SE, Fenaux M, Warfield KL, Greenberg HB, Conner ME. Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol* 2006; 80(13): 6702-5.
12. Boudreaux CE, Vile DC, Gilmore BL, Tanner JR, Kelly DF, McDonald SM. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *J Gen Virol* 2013; 94 (8): 1818-26.
13. Cabral-Romero C, Padilla-Noriega L. Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. *Mem I Oswaldo Cruz* 2006; 101(6): 603-11.
14. Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* 2001; 75(23): 11834-50.
15. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 2001; 75(13): 6052-61.
16. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res* 2014; 190: 75-96.
17. Dickey M, Jamison L, Michaud L, Care M, Bernstein DI, Staat MA. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis* 2009; 28(4): 318-21.
18. Dóro R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, Bányai K. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol* 2014; 28: 446-61.
19. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* 2002; 21(5): 885-97.
20. Estes MK, Cohen JE. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53(4): 410-49.
21. Estes M, Kapikian A. Rotaviruses. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. In: *Fields Virology*. Fourth Edition. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins, 2007; pp.1917-74.
22. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb R, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B, eds. In: *Fields Virology*. Sixth Edition Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins, 2013; pp.1347-401.
23. Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AE, Manning K, Wang CJ, Taylor JA. Rotavirus NSP4 triggers secretion of proinflammatory cytokines from macrophages via toll-like receptor 2. *J Virol* 2013; 87(20): 11160-7.
24. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol* 2002; 76(18): 9545-50.
25. González AM, Azevedo MS, Saif LJ. Intestinal and systemic immunity to rotavirus in animal models and humans. Vajdy M, ed. In: *Immunity Against Mucosal Pathogens*. Dordrecht: Springer, 2008; pp. 263-97.
26. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D. Nuclear localization of cytoplasmic poly (A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* 2008; 82(22): 11283-93.
27. Hirsch AJ. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication. *Future Microbiol* 2010; 5(2): 303-11.
28. Hu L, Chow DC, Patton JT, Palzkill T, Estes MK, Prasad BV. Crystallographic analysis of rotavirus NSP2-RNA complex reveals specific recognition of 5' GG sequence for RTPase activity. *J Virol* 2012; 86(19): 10547-57.
29. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio* 2010; 1(5): e00265-10.
30. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004; 101(1): 67-81.

31. Jayaram H, Taraporewala Z, Patton JT, Prasad BV. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* 2002; 417(6886): 311.
32. Jones S. A brush with rotavirus. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(12): 877-8.
33. Karol S, Suludere Z, Ayvalı C. *Biyoloji Terimleri Sözlüğü*. Beşinci Baskı. Ankara: TDK Yayınları, 2010; s. 306.
34. Karayel I, Fehér E, Marton S, Coskun N, Bányai K, Alkan F. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. *Vet Microbiol* 2017; 201: 7-13.
35. Kumar M, Jayaram H, Vasquez-Del Carpio R, Jiang X, Taraporewala ZF, Jacobson RH, Patton JT, Prasad BV. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *J Virol* 2007; 81(22): 12272-84.
36. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Mol Biol* 1997; 4(2): 118.
37. López T, Camacho M, Zayas M, Nájera R, Sánchez R, Arias CF, López S. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 2005; 79(1): 184-92.
38. Lorrot M, Vasseur M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol J* 2007; 4(1): 31.
39. Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 1987; 27(2): 95-101.
40. Long CP, McDonald SM. Rotavirus genome replication: Some assembly required. *PLoS Pathog* 2017; 13(4): e1006242.
41. Martella V, Ciarlet M, Baselga R, Arista S, Elia G, Lorusso E, Banyai K, Terio V, Madio A, Ruggeri FM, Falcone E. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* 2005; 337(1): 111-23.
42. Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 2006; 346(2): 301-11.
43. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011; 156(8): 1397-413.
44. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2012; 2(4): 426-33.
45. McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010; 397(2): 587-99.
46. McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol* 2011; 19(3): 136-44.
47. Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus non-structural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 2006; 80(18): 9031-8.
48. O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J Virol* 2000; 74(11): 5388-94.
49. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: Structure and assembly. Roy P. ed. In: *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Berlin: Springer, 2006; pp. 189-219.
50. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CY, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 1996; 382(6590): 471.
51. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 78(19): 10213-20.
52. Reidy N, Lennon G, Fanning S, Power E, O'Shea H. Molecular characterisation and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. *Vet Microbiol* 2006; 117(2-4): 242-7.
53. Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, López S. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol* 2013; 87(11): 6336-45.
54. Sastri NP, Crawford SE, Estes MK. Pleiotropic properties of rotavirus nonstructural protein 4 (NSP4) and their effects on viral replication and pathogenesis. Svensson L, Desselberger U, Estes M, Greenberg H. eds. In: *Viral Gastroenteri-*

- tis. Oxford: Academic Press Elsevier, 2016; pp.145-74.
55. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J* 2011; 30(2): 408-16.
 56. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* 2004; 78(14): 7763-74.
 57. Taraporewala ZF, Kumar M, Prasad BV, Patton JT. Structure and function of the rotavirus NSP2 octamer, an essential component of the viroplasm. Patton JT. ed. In: *Segmented Double-Stranded Rna Viruses: Structure and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; pp. 273-89.
 58. Trask SD, Ogden KM, Patton JT. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virology* 2012; 2(4): 373-9.
 59. Von Sochaczewski CO, Pintelon I, Brouns I, Dreier A, Klemann C, Timmermans JP, Petersen C, Kuebler JF. Rotavirus particles in the extrahepatic bile duct in experimental biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2014; 49(4): 520-4.
 60. Vonsover A, Shif IL, Silberstein I, Rudich H, Aboudy YA, Mendelson E, Shulman L, Nakagomi T, Nakagomi O. Identification of feline-and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(7): 1783-7.
 61. Zhang YD, Li H, Liu H, Pan YF. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8* sialic acid-binding domain of porcine rotavirus strain OSU. *Acta Crystallogr F* 2007; 63(2): 93-5.



Bruselloz Tanısı ve Epidemiyolojik Çalışmalarda Moleküler Yöntemlerin Kullanılması

Oktay GENÇ¹ Gülnur SERDAR²

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun-TÜRKİYE

²Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Samsun-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Oktay GENÇ; E-mail: ogenc@omu.edu.tr ; ORCID: 0000-0003-0777-6824

Atıf yapmak için: Genç O, Serdar G. Bruselloz tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 23-28.

Özet: Brusellozis, Latin Amerika, Orta doğu, Afrika ve Asya'da endemik seyreden zoonotik bir enfeksiyondur. Günümüze kadar 11 *Brucella* türü tanımlanmıştır. *Brucella* türleri içerisinde insanlarda en şiddetli enfeksiyona neden olan *B. melitensis* türü olup bunu *B. suis* ve *B. abortus* izlemektedir. *Brucella* türleri farklı sayılarda biyovarlardan oluşmakta ve immün serumlar ile aglütinasyon, bazı boyalar ve fajlara duyarlık özelliklerine göre de ayırımları yapılmaktadır. Enfeksiyon kaynağının tespiti, enfeksiyon ve/veya aşı suşlarının karakterizasyonu ve yeni türlerin ortaya konulması önceleri biyovarlara göre yapılır iken, son yıllarda Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi PZR tabanlı yöntemler ile Multilokus variable number tandem repeat analysis (MLVA), Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) gibi moleküler test ve yöntemler ile yapılmaktadır. Bu derleme ile bu yöntemler ve bu alanda yapılan çalışmalar ile ilgili güncel bilgiler sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Brusellozis, LAMP, moleküler tanı, MLST, MLVA

Molecular Methods and Applications in Brucellosis Diagnosis and Epidemiological Studies Molecular Methods in Brucellosis

Summary: Brucellosis is an endemic zoonotic infection in Latin America, the Middle East, Africa and Asia. Up to 11 *Brucella* species are described. Among the *Brucella* species, *B. melitensis* is the most severe infectious species in humans, followed by *B. suis* and *B. abortus*. These *Brucella* species are differentiated into biovar and characterized by immunological sera and agglutination, some dyes and phage susceptibility properties. However, some biovars can not be distinguished by these methods and additional molecular tests such as Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA), Multilocus Sequence Typing (MLST) and PCR based methods such as Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) are needed for the detection of infection source. This compilation provides current information on these methods and the work done in this area.

Key words: Brucellosis, LAMP, molecular diagnosis, MLST, MLVA

Giriş

Brusellozis günümüzde hala önemli zoonotik hastalıklardan biri olarak yerini korumaktadır. Birçok ülkede eradikasyonu başarılı ise de yabani ve evcil hayvanlarda tüm kıtalarda özellikle Akdeniz bölgesinde, Ortadoğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika'da endemik olarak seyretmektedir (5,35). Brusellalar tanımlanmalarına, tür ve biyotip ayırımlarına rağmen klasik yöntemler ile suşlarının epidemiyolojik orijinleri ve suşlardaki varyasyonlar izlenememektedir (12). Saha suşlarının klonal benzerliklerinin, enfeksiyon kaynağının ve yeni *Brucella* türlerinin belirlenmesinde biyotiplendirme yöntemlerinin yeterli ayırımı sağlayamaması derlemede anlatılan moleküler yöntemlerin kavranmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (24,25). Bu yöntemler, LAMP ve RFLP gibi PZR tabanlı metotlar ile MLVA ve MLST gibi moleküler test ve yöntemlerdir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve "Loop Mediated Isothermal Amplification" LAMP uygulamaları

Brucella tür ve bazı biyovarlının tanımlanması etkenin üreme özelliklerine, serotiplendirme ve bakteriyofaj tiplendirme yöntemlerine göre yapılmakta, ancak epidemiyolojik araştırmalar için önemli olan suşlar arasındaki farklılıkların belirlenmesidir. Epidemiyolojik ilişkiler önceleri biyovarlara göre yorumlanır iken, yeni marker genlerin veya DNA dizilerinin belirlenmesi; PZR, PZR'ye dayalı yöntemler ile birlikte MLVA ve MLST gibi moleküler yöntemlerin kullanımını gerekli kılmıştır (6,9,17,27,34,40). *Brucella* türlerinin PZR ile belirlenmesinde saha örneklerinde, polimeraz aktivitesinin lipid, nükleaz, yüksek divalent Ca iyonları ile engellenmesi ve DNA amplifikasyon sorunlarına rağmen daha sensitiv ve kısa süreli sonuç vermesi özellikleriyle PZR tabanlı testler kültür testlerine tercih edilmektedir (31,41). *Brucella* teşhisi amacıyla ilk PZR uygulamalarından sonra çeşitli moleküler markerlar tür spesifik identifikasyon amacıyla kullanılmış-

tır (1,9,14,25,30). Brusellanın cins ve tür düzeyinde PZR ile ayırımı amacıyla çeşitli genler belirlenmiştir (7,29). Bu amaçla kullanılan bazı genler 16S rRNA, BCSP31, omp2, omp19, bp26, IS711'dir (28). Günümüze kadar PZR-tabanlı metotlara yönelik 400'ün üzerinde araştırma mevcut olup Yu ve Nielsen (42) bu çalışmaların bir kısmını yayınlamıştır. Bricker ve Halling (2), 4 *Brusella* türünü (sırasıyla *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis*) *Brusella* tür isimlerinin baş harflerinden ibaret bir sinonim "AMOS-PZR" ile ifade edilen bir yöntem ile belirlediğini bildirmiştir. Aşı suşlarının ve *B. abortus* biovar 3,5,6 ve 9'un belirlenmesi bu yöntem ile mümkün olmamıştır. Bu ayırımı yapabilmek amacıyla Bricker ve Halling (3), *B. abortus* S19 ve RB51 ayırımını AMOS-PZR'a 3 oligonükleotid ilavesi ile yapmış ve bu testi multipleks AMOS-PZR olarak adlandırmıştır. Daha sonra Garcia-Yoldi ve ark (10), çabuk ve tek bir basamakta *Brusella* ayırımını yapabilen yeni bir multipleks PZR testi geliştirmişlerdir. Genç ve ark (13) ile Terzi ve ark (36) yaptıkları çalışmalarda Lopez-Goni ve ark (19) tarafından önerilen primerlerden bazıları ile tür düzeyinde teşhis ve aşı suşu-saha suşu ayırımı çalışmalarını yapmışlardır. Elde edilen sonuçlar hem pratik olması hem de spesifik olması ile avantajlar sağlamıştır. Lopez Goni ve ark (19), *Brusella* tür ve aşı suşları *B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 ve *B. abortus* RB51 ayırımını yapabilen Bruce-ladder olarak tanımlanan bir multipleks PZR geliştirmişlerdir. Bu test, *B. canis* ve *B. suis* ayırımını da yapabilen ilave primerler ile gerçekleştirilmiştir. *Brusella* türlerinin moleküler teşhisi amacıyla "point of care" olarak adlandırılan hızlı, etkin ve duyarlı sonuçlar elde edilen LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) yöntemi geliştirilmiştir. LAMP protokolünde, zincir yer değişikliği aktivitesini sağlayan Bst DNA polimeraz enzimi ve gende 6 bölgeyi tanımlayan 4 primer çifti kullanılmaktadır (22,37). Test süresi konvansiyonel PZR'de 2-3 saat iken, bu test ile 30-60 dakikaya inmektedir. Gendeki çeşitli bölgeleri tanımlayan spesifik primerler testin spesifitesini artırır iken ilave loop primerlerinin kullanımı sensitiviteyi artırmaktadır. Ayrıca termal cykler ve jel görüntüleme gibi sofistike materyallere ihtiyaç duyulmaması testin diğer bir avantajıdır. Bu test DNA ürünleri ile birlikte fazla miktarda pirofosfat moleküllerinin birikimine neden olmakta ve bu durum Calcein ve Mangan gibi florofor boyaların ilavesi ile gösterilmektedir. Reaksiyonun başlangıcında calcein, floresans mangan iyonları tarafından söndürülür sonraki dönemlerde biriken DNA ürünleri pirofosfat moleküllerine bağlanarak floresan verir. Bu ürünler divalent Mg iyonlarına bağlanarak çoğaltılır ve çıplak gözle gözlenebildiği gibi elektroforez ve UV kaynağı ile de tespit edilmektedir. Kolorimetrik tespit ise Hidroksinaftol blue ve SYBR Green gibi boyaların ilavesi ile mümkündür, bu boya ile negatif örnekler menekşe renge, pozitif örnekler ise gökyüzü mavisine dönüşmektedir. Brusellanın LAMP ile teşhisi ilk olarak Ohtsuki ve ark (23) tarafından BCSP31 geni baz alınarak yapılmıştır. Bu

çalışmada 22 suş içerisinde 6 *Brusella* türünün 10fg konsantrasyonda tespiti mümkün olmuştur. Test 63°C de 35 dakikada gerçekleştirilmiştir. Pan ve ark (26) süt örneklerinde omp25 gen bazlı LAMP testi ile oldukça yüksek sensitivite (1.3×10^3 cfu/ml) de genomik DNA tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Multi lokus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

Brusella enfeksiyonunun takibi açısından biyovar ve suş farklılıklarının belirlenmesi özellikle birçok biyotipin yaygın olduğu populasyonlarda önemlidir. Yüksek oranda konservasyona rağmen bu amaçla birçok farklı testin geliştirilmesi devam etmektedir. Bu alanda özellikle *B. suis*, *B. melitensis* ve *B. abortus* genom karşılaştırmaları yapılmaktadır (7). *B. melitensis*'de 3100 özel ve değişken gen belirlenmiş ve bunların bir kısmı potansiyel diyagnostik marker, bir kısmı da *Brusella* türlerinin ayırımı amacıyla kullanılmıştır. Yakın akraba *Brusella* türlerinin ayırımı amacıyla 3 *Brusella* biyovarı (*B. abortus* 941, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M) genomik sekans verileri kullanılmaktadır. Brusellanın moleküler tiplendirilmesi amacıyla birçok yöntem mevcuttur. Az sayıda polimorfizm nedeniyle çoğu genetik teknikler ile türler içerisindeki suşların ayırımı oldukça güçtür. Bu ayırım için en iyi yaklaşımlardan biri multi lokus variable number tandem repeat analysis (MLVA)'dır (39). MLVA, lokal epidemiyolojilerin ve enfeksiyon tespitinde retrospektif olarak sonuçların değerlendirilmesinde hala ilk tercih olarak önem taşımaktadır. Bu yöntem ile, mutasyon oranlarındaki sıklık, aşı ya da pasajı yapılan suşlardan orijin alan çok sayıda izolatin araştırılması mümkündür. MLVA harici diğer moleküler yöntemler biyovar düzeyinde sınırlı bilgi vermesi itibarı ile tercih edilmemektedir. *Brusella* tür ve biyovarları günümüzde 16 genetik bölge temel alınarak MLVA ile detaylı olarak tiplendirilmektedir. Şu ana kadar 8, 10, 11, 15, 16 ve son olarak da 21 lokus araştırmalarda kullanılmıştır. MLVA tiplendirilmesinde, 16 değişken tandem tekrar bölgelerinin belirlenmesi ile *Brusella* izolatlarının izlenmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir (4,18). *Brusella* MLVA veritabanı 2006 yılında Fransanın Orsay şehrinde Paris Sud Üniversitesinde geliştirilmiştir. O zamandan beri bu programa düzenli olarak yeni veriler eklenmektedir (32). Bakterilerde sıralı olarak (tandemly) tekrar sekansları minisatellit (9 bp ve üzeri) ve mikrosatellit (8 bp'e kadar tekrar ünitesi) bulunmaktadır (38). MLVA-16_{Orsay} olarak adlandırılan bu MLVA genotiplendirme sistemi, 8 adet minisatellit ve 8 adet de mikrosatellit marker içermektedir. Minisatellit markerlardan türlerin belirlenmesi, mikrosatellitlerden ise alttürlerin ayırımı amacıyla yararlanılmaktadır. Satelitleri oluşturan DNA dizileri 2 panele ayrılarak lokus numarasına göre adlandırılmaktadır. Panel-1'i oluşturan minisatellit markerlar Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 ve Bruce55 iken, Panel 2'yi oluşturan mikrosatellitler 2A (Bruce18, Bruce19 ve Bruce21) ve

2B (Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce30) olarak iki grupta değerlendirilmiştir. Dünyada insan ve hayvan orijinli *Brusella* izolatlarının bulunduğu ve karşılaştırmaların yapılabildiği bir web sitesi mevcuttur (<http://mlva.u-psud.fr>) (21). MLVA16 paneli ile 2000'ün üzerinde *Brusella* izolatı ile ilgili bilgilere internet veri tabanından ulaşmak mümkündür (29). Online olarak MLVABank5.0 tutorial version 4.6 programından yararlanılarak MLVA veya CRISPR verileri girilerek genotipik çeşitlilik, yaygınlık indeksi, filogenetik ağaç çizimi ve coğrafik karşılaştırmalar (<http://mlva.u-psud.fr/>) yapılmaktadır. Genetik benzerliklere göre cluster ve gruplandırma yapılmaktadır. Cluster ve gruplandırma işlemi, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) algoritmasına ve kategorik mesafenin belirlenmesine göre yapılmaktadır. Elektroforez sonuçları BioCalculator (Bionumerics 6.5) gibi yazılım programları vasıtasıyla standart süşun ampikon büyüklüğü ile karşılaştırılarak VNTR alel Tablo'sundan yararlanılarak ilgili lokustaki tekrar ünite sayılarına dönüştürülür. Genetik diversity, Hunter-Gaston diversity index ve güven aralığı (CI) online olarak (www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl) biyoinformatik araçlarla yapılabilmektedir. İlk MLVA testi, 2003 yılında Bricker ve ark. (4) tarafından HOOF-print olarak adlandırılan hypervariable octameric oligonükleotid fingerprintler olarak ifade edilmiş ve *Brusella* cinsinin, AGGGCAGT olarak bilinen tekrar üniteyi içerdiği belirlenmiştir.

Çeşitli araştırmacılar *Brusella* aşularının biyolojik aktivitelerini araştırmak amacıyla MLVA yöntemlerinden yararlanmışlardır. Bricker ve ark (4), marker RB51 aşu suşunda HOOF-print yöntemi ile allelik mutasyon belirleyemediklerini bildirmişler, Garcia-Yoldi ve ark (11) *B. melitensis* Rev1 aşu suşlarının stabilitesinin ifadesi amacıyla toplam 36 aşu suşu MLVA ile incelemişler ve 7 farklı genotip belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu genotiplerin Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce18 lokuslarında bir tekrar ünite değişikliğiyle karakterize olduğunu açıklamışlar ve Rev1 aşu suşlarının genetik olarak homojen olduğunu bildirmişlerdir. Miranda ve ark (20) ise Brezilya'da üretilen *B. abortus* S-19 aşu suşlarının genetik stabilitesini belirlemek amacıyla immünojenite, rezidüel virülens ve genetik profil özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar toplam 8 aşu suşu ile United States Department of Agriculture (USDA) referans aşu suşu karşılaştırmalarını yapmışlardır. Araştırmada toplamda 8 aşu suşa ait 2 batch ve referans aşu suşu kullanmışlardır. İncelenen batch'lerin Bruce07 lokusunda 6 tekrar ünitesi, aşu suşunda ise 5 tekrar ünitesi belirlenmişlerdir. Farklı bir profili gösterse de bu mutasyonun, aşunun etkinliği üzerinde olumsuz bir etki göstermediğini bunun sadece aşuya ait bir marker olarak kullanılabilmesi sonucunu çıkarılmışlardır. Tüm bu araştırmalar in-vitro aşu kontrolleri amacıyla MLVA'nın kullanımının önemli olduğunu göstermiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda Garcia Yoldi ve ark (11), 36 Rev1 izolatı ve 16M suşları içerisinde MLVA-15 ile 11 lokusta identik profil belir-

lerken bazı izolatlarda 4 lokusta (Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce18) farklılık belirlenmişlerdir. Aşu suşlarının izlenmesine yönelik yapılan diğer çalışmalarda, Dorneles ve ark. (8), *B. abortus* S19 aşu suşları içerisinde bir aşu suşta Bruce 07 lokusunda 5 yerine altı tekrar ünitesi, RB51 aşu suşlarında 2 grup belirlenmişler yine aynı lokusta 7 yerine 6 tekrar ünitesi tespit etmişlerdir. Her ve ark (15), 2 *B. abortus* suşunun HOOF-3 lokusunda varyasyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar toplam 9 cluster içerisinde 23 genotip tespit etmişlerdir. *B. abortus* 544 ve *B. abortus* 2308 referans suşları, 2 izolat ve 30'a kadar pasajı yapılan suşlar ile yapılan çalışmalarda; *B. abortus* 544 suşunun 4, 16 ve Hoof 3 lokuslarında değişiklik belirlenirken diğer lokuslarda ve suşlarda değişiklik belirlenmediğini bildirmişlerdir. Farklı lokuslardaki mutasyonların belirlenmesi gelecekte farklı allellerin epidemiyolojik çalışmalar için kullanılabilmesini göstermektedir. Türkiye'de gerek insanlardaki *Brusella* suşları (16) gerekse hem insan hem koyun hem de sığır suşları (33) MLVA ile tiplendirilmiştir. Kılıç ve ark (16) yaptıkları genotiplendirme sonucu 162 *Brusella* izolatının 105 genotip taşıdığını belirleyerek 73'ünün tek aşu suşta, 32'sinin 2-8 aşu suşta tespit edildiğini bildirmişlerdir. Sidamonidze ve ark. (33) Gürcistan ve Türkiye'deki hayvan ve insan kaynaklı suşların genotiplendirmesini yapmışlar, Türkiye'deki izolatların Doğu Akdeniz grubunda yer aldığını belirlenmişler, sadece 2 *B. melitensis* suşunun klonal benzerliğinin Türkiye ve Gürcistan için ortak olduğunu tespit etmişlerdir.

Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST): Önceleri (39) 9 housekeeping gen ile 27, bugün için ise 78 sekans tipinin belirlendiği açıklanmıştır. Sekans tiplerinin gap, aroA, glk, dnaK, gyrB, trpE, cobQ, omp25 ve int-hyp genlerine göre tanımlandığı ve çeşitliliğin en çok glk geninde olduğu bildirilmiştir. Ayırım gücünü artırmak amacıyla 9 gene ilave 12 gen ilavesi ile toplamda 21 lokusa ait gen ile 141 sekans tipinin belirlendiği bildirilmektedir. Hem 9 hem de 21 lokusa ait MLST veritabanına <http://pubmlst.org/brucella/> web adresinden ulaşılabilir (40).

Sonuç

*Brusella*ların tiplendirilmesinde her ne kadar farklı moleküler yöntemler mevcut ise de *Brusella* biyotiplerinin ve suşlar arasında varyasyonların belirlenmesi için en önemli yöntem MLVA olarak karşımıza çıkmaktadır. Mevcut MLVA tiplendirme yöntemleri, referans *Brusella* suşlarının veya aşu-izolatların izlenmesi, olası mutasyonların, bulaş kaynaklarının veya coğrafik dağılımın belirlenmesi için tek metot olarak kabul görmektedir. İlave ayırıcı markerlar belirlenmeye kadar *Brusella* suşlarının genotiplendirmelerinin MLVA ile yapılması ve koleksiyonların bu doğrultuda oluşturulması *Brusella* suş/izolat bankasının geriye dönük olarak oluşumunu da sağlamış olacaktır.

Kaynaklar

1. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2001; 83 (1): 37-44.
2. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2660-6.
3. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6): 1640-2.
4. Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(4): 374-8.
5. Corbell MJ. Brucellosis: An overview. *Emerg Infect Disease* 1997; 3(2): 213-21.
6. De Massis F, Ancora M, Atzeni M, Rolesu M, Bandino E, Danzetta ML, Zilli K, Di Ginnatale E, Scacchia M. MLVA as an epidemiological tool to trace back *Brucella melitensis* biovar 1 re-emergence in Italy. *Transbound Emerg Dis*, 2015; 62(5): 463-9.
7. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(1): 443-8.
8. Dorneles EM, de Faria AP, Pauletti RB, Santana JA, Caldeira GA, Heinemann MB, Titze-de Almeida R, Lage AP. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine* 2013; 31(42): 4856-9.
9. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1990; 69(2): 216-27.
10. Garcia-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Munoz PM, Vizmanos JL, Lopez-Goni I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem* 2006; 52(4): 779-81.
11. Garcia-Yoldi D, Le Fleche P, Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, Cvetnic Z, Marin CM, Vergnaud G, Lopez-Goni I. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12): 4070-72.
12. Genç O, Kamber U. Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Indian Vet J* 2004; 81: 1164-5.
13. Genç O, Büyüktanır Ö, Doğancı L, Yurdusev N. *Brucella* tanısında "in-house" enzimatik immunoassay modeller ve multiplex PCR ile tür ayırımı: Ön sonuçlar. Klimik XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 2007, Antalya.
14. Güler L, Gündüz K, Ok U. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol* 2003; 93: 53-61.
15. Her M, Kang SI, Cho DH, Cho YS, Hwang IY, Heo YR, Jung SC, Yoo HS. Application and evaluation of the MLVA typing assay for the *Brucella abortus* strains isolated in Korea. *BMC Microbiol* 2009; 9: 230.
16. Kılıç S, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslıoğlu E, Uyanık MH, Aliskan H, Yasar E, Bayramoğlu G, Arslantürk A, Vergnaud G, Kantardjiev TV. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (9): 3276-83.
17. Kumkrong K, Chankate P, Tonyoung W, Intarapuk A, Kerdsin A, Kalambaheti T. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Brucella* isolates from Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2017; 48(1): 124-42.
18. Le Fleche I, Grayon JM, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoed F, Nöckler F, Neubauer H, Guilloteau L, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 2006; 6(9): 1-14.
19. Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckaert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa de Sa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3484-7.
20. Miranda KL, Poester FP, Minharro S, Dorneles

- EM, Stynen AP, Lage AP. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. *Vaccine* 2013; 31(29): 3014-8.
21. MLVA-NET for Brucella. <http://mlva.u-psud.fr>. Erişim tarihi: 19.12.2017
22. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E63.
23. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J App Microbiol* 2008; 104: 1815-1823.
24. OIE2009. Bovine brucellosis. http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELLA.pdf Erişim tarihi: 10.01.2017.
25. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7(5): 507-16.
26. Pan W, Wang JY, Shen HY, Zhao MQ, Ju CM, Dong XY, Yi L, Chen JD. Development and application of the novel visual loop-mediated isothermal amplification of *Omp25* sequence for rapid detection of *Brucella* sp. *J Anim Vet Advances* 2011; 10(16): 2120-6.
27. Piao D, Liu X, Di D, Xiao P, Zhao Z, Xu L, Tian G, Zhao H, Fan W, Cui B, Jiang H. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BMC Microbiology* 2018; 18 (7): 1-6.
28. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1290-3.
29. Ratushna VG, Sturgill DM, Ramamoorthy S, Reichow SA, He Y, Lathigra R, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM, Gibas CJ. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiol* 2006; 6(13): 2180-6.
30. Rijpens N, Jannes G, Asbroeck MV, Rossau R, Herman LMF. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(5): 1683-88.
31. Rossen L, Norksov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
32. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterization of *Brucella* species. *Rev Sci Tech* 2013; 32 (1): 149-62.
33. Sidamonidze K, Hang J, Yang Y, Dzavashvili G, Zhgenti E, Trapaidze N, Imnadze P, Nikolich MP. Genome sequences of human and livestock isolates of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from the country of Georgia. *Genome Announc* 2017; 5(6): 1-3.
34. Sun M, Jing Z, Di D, Yan H, Zhang Z, Xu Q, Zhang X, Wang X, Ni B, Sun X, Yan C, Yang Z, Tian L, Li J, Fan W. Multiple locus variable number tandem repeat and single nucleotide polymorphism based *Brucella* typing reveals multiple lineages in *Brucella melitensis* currently endemic in China. *Front Vet Sci* 2017;4: 1-10.
35. Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S. Investigation of bovine brucellosis in the northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2008; 40(4): 281-6.
36. Terzi G, Büyüktanır Ö, Genç O, Gücükoğlu A., Yurdusev N. Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*,16(Suppl-A). 2010; 47-52.
37. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008; 3(5): 877-82.
38. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) analysis Stackebrandt E ed. In: *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer,. 2006; pp: 83-104.
39. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Inf Gen Evol* 2009; 9(6): 1168-84.
40. Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Smallbone JE, Gopaul KK, Perrett LL. Extended multi-locus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: Phylogeography and relationship to biovars. *Front Microbiol* 2016; 7: 2049.
41. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63 (10): 3741-51.
42. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J* 2010; 51(4): 306-13.



Chocolate Intoxication in a Budgerigar*

Kemal Varol^{1*}, Gencay Ekinci², Vehbi Güneş², İhsan Keleş², Ali Cesur Onmaz²

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

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

*Corresponding author: Asst. Prof. Kemal Varol; E-mail: kmlvrl@yahoo.com; ORCID: 0000-0002-3057-2865

How to cite: Varol K, Ekinci G, Güneş V, Keleş İ, Onmaz AC. Chocolate intoxication in a Budgerigar. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 74-77.

Summary: Chocolate cause clinical symptoms in birds as other animals and is well known food toxin for animals. Toxic components of chocolate are theobromine and caffeine that are within methylxanthines. In this case report; male, four months old budgerigar with abnormal behaviour, hyperactivity, tremors, ataxia, loss of appetite, vomiting, diarrhoea referred to our clinic. According to anamnesis the budgerigar had no health problem up to last 12 hours. But, since last 12 hours, the budgerigar had eaten cakes containing chocolate about the size of hazelnut and at the same time it had also eaten 15-20 sugar about the size of rice which covered with cacao, according to the owner. After that, the budgerigar ate cake containing chocolate about the size of hazelnut and also 15-20 sugar covered with cacao. After this complaints mentioned above started. In the clinical examination of the budgerigar; body temperature was 41.8°C, respiration rate was 65/minutes. In the Electrocardiography findings, pulsation was 235 beat/minutes, and ventricular arrhythmias was found. In treatment; activated carbon tablet (3 mg/kg) were applied to the bird in every 12 hours. Owner informed that the bird got to normal health 24 hours after the treatment. As a result; with this case report chocolate intoxication and treatment were mentioned in budgerigar.

Key words: Budgerigar, chocolate toxication, cocoa, theobromine poisoning

Bir Muhabbet Kuşunda Çikolata Toksikasyonu

Özet: Çikolata Theobroma kakaonun kavrulmuş tohumlarından elde edilen ve diğer hayvanlarda olduğu gibi kuşlarda da klinik semptomlara neden olduğu iyi bilinen bir gıda toksinidir. Çikolatanın toksik bileşenleri metilksantinlerden olan teobromin ve kafeindir. Bu vaka anormal davranış, hiperaktivite, titreme, denge bozukluğu, iştahsızlık, kusma, ishal şikâyeti kliniğimize getirilen dört aylık erkek bir muhabbet kuşunda değerlendirildi. Alınan anamnezde; son 12 saate kadar herhangi bir sağlık probleminin olmadığı öğrenildi. Fakat, muhabbet kuşunun son 12 saatte fındık büyüklüğünde çikolata içeren kekleri yediği ve aynı zamanda, pirinç büyüklüğünde çikolata ile kaplı yaklaşık 15-20 adet şekeri de yediği hasta sahibi tarafından ifade edildi. Bunu takiben şikayetlerin ortaya çıktığı bilgisi alındı. Muhabbet kuşuna yapılan genel klinik muayenede; vücut ısısının 41.8°C, solunum frekansının 65/dk, olduğu tespit edildi. Elektrokardiyografi bulgularında nabız frekansının 235 atım/dakika ve ventriküler taşikardi olduğu belirlendi. Tedavide kuşa 1-3 mg/kg dozunda aktif kömür 12 saat ara ile uygulandı. Tedaviden 24 saat sonra muhabbet kuşunun normale döndüğü öğrenildi. Muhabbet kuşlarında çikolata toksikasyonunu ve sağaltımı bu vaka raporu ile belirlendi.

Anahtar kelimeler: Çikolata, çikolata toksikasyonu, kakao, muhabbet kuşu, teobromin zehirlenmesi

Introduction

The main reason for chocolate toxication is theobromine (3.7 methylxantines) and caffeine (1. 3. 7-trimethylxantines) ingredients (3,9,10). Although theobromine concentration in chocolate is three to 10 times higher than cafein, both of them contribute to clinical symptoms seen in chocolate toxication (1,3,17). Theobromine and caffeine absorbed easily from gastrointestinal (GI) canal and spread to whole body. Theobromine and caffeine metabolised in liver

and it is subjected to enterohepatic recycling (1,3). Theobromine and caffeine inhibit competitive cellular adenosine receptors. As a result, central nervous system (CNC) stimulation, diuresis, and tachycardia may occur. Methylxantines increase uptake of cellular Ca⁺⁺ and in striated muscles inhibits intracellular Ca⁺⁺ excretion, thus, cause increasein intracellular Ca⁺⁺ level. The effects are; increased skeletal and cardiac muscle contraction (1,3,8,9,10).

Clinical signs of chocolate toxication are vomiting, diarrhoea, restlessness, hyperactivity, polyuria, ataxia, rigidity, tremors, and seizures. Tachycardia, premature ventricular contractions, tachypnea, cyanosis, hypertension, hyperthermia, bradycardia, hypotension, or coma may occur (1,3,8,9). Death mainly oc-

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.

cur as a result of heart rhythm disorders, hyperthermia or insufficient respiration (8). The diagnosis of chocolate toxication mainly based on clinical findings and anamnesis of chocolate exposure. There is no specific antidote for chocolate intoxication. The aim of treatment in chocolate toxicity is to maintain basic life support, reduce the absorption, increase the removal of alkaloids, symptomatic relief of seizures, regulate the respiratory difficulties and correct cardiac dysfunction (3).

Case Report

In this case report; male, four months old budgerigar with abnormal behaviour, hyperactivity, tremors, ataxia, loss of appetite, vomiting, diarrhoea referred to our clinic. According to anamnesis the budgerigar had no health problem up to last 12 hours. But, since last 12 hours, the budgerigar had eaten cakes containing chocolate about the size of hazelnut and at the same time it had also eaten 15-20 sugar about the size of rice which covered with cacao, according to the owner. After this feeding complains mentioned above started according to anamnesis. In the clinical examination of the budgerigar; body temperature was 41.8°C, respiration rate was 65. In electrocardiography (ECG), pulsation was 235 beat/minutes, and ventricular arrhythmias was found. The ECG (Cerewell ECG 110336 Vet, China) was applied at 25 mm/s. Due to the clinical findings and anamnesis; diagnosis considered as chocolate toxication. activated carbon tablet (3 mg/kg) were applied to the bird in every 12 hours for treatment. Furthermore, diphenhydramine HCL (2.2 mg/L) was also suggested to the animal owner for sedation. We were informed by animal owner that the bird got to normal health 24 hours after treatment. As a result; with this case report chocolate intoxication and treatment were mentioned in budgerigar (Table 1 and Figure 1).

Result and Discussion

Table 1. ECG findings of II derivation in budgerigar having chocolate intoxication and in healthy budgerigar

Parameters	Chocolate intoxication	Healthy
P amp	0.1 mv	0.2
P ms	0.15	0.12
PR int	0.035	0.06
QRS int	0.045	0.07
ST interval	0.038	0.03
QT interval	0.08	0.065
T amp.	0.15	0.2
Frekans	235	195

Chocolate cause clinical symptoms in mammals and birds and it is one of the well known food toxin (4,13). Toxic components of chocolate are theobromine and caffeine which are both methylxantines (3,8). Domestic animals may exposed to chocolate or cocoa products such as candies, cakes, cookies,



Figure 1. Anxious appearance of the budgerigar

baking ingredients (such as particles of chocolate, cocoa powder), and cocoa bean mulches (5). Likewise, in this case report, a budgerigar ate a cake containing chocolate and also sugar covered with chocolate, thus, had intoxication symptoms. Studies about toxic effects of methylxantines in birds could not be cited. But, this kind of components known to antagonize adenosine receptors in mammals (3,13,15,18). Although adenosine receptors present in whole body, methylxantines mostly effect receptors present in the nervous system and cardiovascular tissue. In cardiovascular system, antagonising effects of these receptors were end up with tachycardia, hypertension and ventricular arrhythmia in the ECG (3,8,9,18).

Normal ECG values in many birds still have not been determined. In addition, ECG traces in birds should

be taken at 100-200 mm/s (14). Furthermore, during ECG examination of birds, restraining and positioning of them cause severe stress (6). In this case presentation, pulsation determined to be 235 beat/minute at ECG and ventricular arrhythmia were also observed. To understand if this ventricular arrhythmia due to

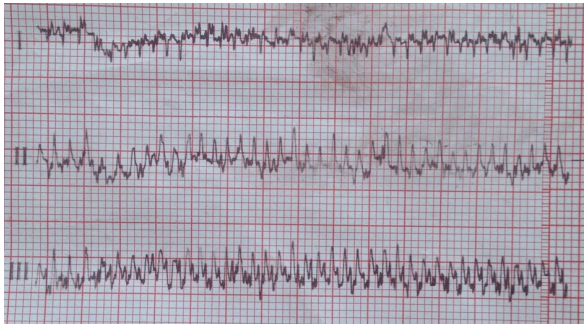


Figure 2. ECG findings in budgerigar having chocolate intoxication

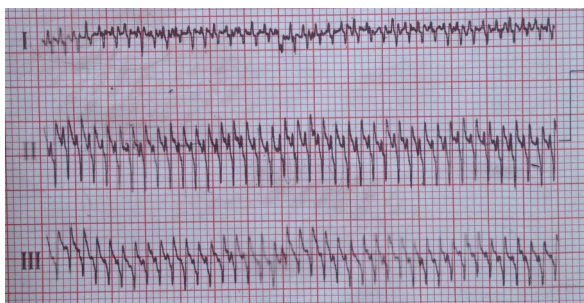


Figure 3. ECG findings healthy budgerigar

stress or not, a healthy budgerigar at the similar age and same breed was examined, pulsation found 195 beat/minute and had a normal sinus rhythm. According to these results ventricular tachycardia in the budgerigar may develop due to chocolate poisoning. On the other hand, in this present case report, ECG were taken at 25 mm/s due to our ECG readers' insufficiency (Figure 2 and Figure 3). Reading ECG traces were very difficult. So, ECG in birds suggested to be taken at 100-200 mm/s as reported in the literature (14).

In central nervous system, adenosine receptors have locomotors antidepressant, anxiolytic, and sedative effects. Inhibition of adenosine receptors by Methylxanthines cause stimulation of the central nervous system, hyperactivity and anxiety (3,7,11,13,15). Seizures and hyperalgesia can also be seen (13). Sera et al. (17) reported a chocolate toxication in a mynah bird which had abnormal behaviours like aggression, changing habits, excitement, hyperesthesia, seizures or syncope findings. Similar symptoms were also observed in our case report.

As a result of kidney adenosine receptor inhibition, kidney functions reduce and polyuria draw attention (3,11,13,18). In the present case report, observed more liquid dropping believed to the result of polyuria.

Other clinical symptoms of chocolate intoxication are platelet aggregation, anorexia, dullness, vomiting (regurgitation in birds), muscle tremors, hyperthermia, increased respiratory rate, cyanosis, coma, and

death (3,8,13,17,18). Similarly in this case report, anorexia, dullness, and regurgitation were observed

In animals, clinical symptoms can develop in a few minutes or a few hours and after in a while eating chocolate can be lethal (7). In the present case, clinical symptoms started four-five hours after chocolate intake according to anamnesis and these symptoms continued until their application to our clinic 12 hour after food intake.

Fluid diuresis can help stabilizing cardiovascular function and accelerating urinary excretion of methylxanthines (1). Due to the abnormal behaviour, hyperactivity, tremors, ataxia iv fluid infusion was not performed. For this reason oral fluid application was used.

In the treatment, methocarbamol or diazepam (0.5 mg/kg intravenous) can be use for tremor, mild seizures, and in severe seizures; barbiturates and diphenhydramine HCl 2.2 mg/L of drinking water for the control of tremors (1,2,10,17). In the present case report, diphenhydramine HCl were suggested.

In the treatment, removal of GI content has also been suggested (6,12,16). Especially in birds, the high possibility of aspiration of regurgitation, following 1-3 g/kg activated carbon tablet application lavage of proventriculus has been suggested (1,6,8,12,16). But, in this case, because the bird applied to our clinic 12 hours after chocolate intake, lavage was not implemented. But, to reduce absorption 1-3 g/kg activated carbon tablet administered and because of the enterohepatic recirculation of methylxanthines, repeated doses should be administered every 12 hour in symptomatic animals for as long as signs are present (1). Twenty four hours after treatment the bird became well, this treatment believed to have an impact in this outcome as reported in the literature.

As a result, in the light of these information's the present case report is the first report on chocolate intoxication in budgerigar. Treatment strategies were also discussed and believed to be helpful to the practitioners that facing such problems. Further studies in terms of this subject also suggested to enlighten the issue.

References

1. Aiello SE. Topics in Food Hazards Chocolate Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Kenilworth, N.J, U.S.A http://www.merckvetmanual.com/mvm/toxicology/food_hazards/chocolate.html. Date of access: 07.03.2017.
2. Carpenter JW. Exotic Animal Formulary. Third Edition. St Louis (MO): Elsevier, 2005; pp. 202-29.

3. Carson TL. Methylxanthines. Peterson ME, Talcott, PA. eds. In: Small Animal Toxicology. Second Edition. Saunders, Missouri: Elsevier 2006; pp. 845-52.
4. Cole G, Murray M. Suspected chocolate toxicosis in an African grey parrot (*Psittacus erithacus*) (700). Association of Avian Veterinarians Conference and Expo. August, 8-12, 2005; Monterey-California.
5. Drolet R, Arendt TD, Stowe CM. Cacao bean shell poisoning in a dog. J Am Vet Med Assoc 1984; 185(8): 902.
6. Dumonceaux G, Harrison GJ. Toxins. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, eds. Avian Medicine Principles and Application. Delray Beach (FL): HBD International, 1999; pp. 1030-49.
7. Gartrell BD, Reid C. Death by chocolate: A fatal problem for an inquisitive wild parrot. NZ Vet J 2007; 55(3): 149-51.
8. Gwaltney-Brant S. Chocolate intoxication. Vet Med 2001; 96(2): 108-11.
9. Johnston J. Evaluation of cocoa- and coffee-derived methylxanthines as toxicants for the control of pest coyotes. J Agric Food Chem 2005; 53(10): 4069-75.
10. Kaya S, Traş B. Mss'yi uyaran ilaçlar. Kaya S. eds. In: Veteriner Farmakoloji. Dördüncü Baskı. Ankara: Medisan, 2006; pp. 326-7.
11. Kovalkovičová N, Šutiaková I, Pistl J, Šutiak, V. Some food toxic for pets. Interdiscip Toxicol 2009; 2(3): 169-76.
12. LaBonde J. Toxicity in pet avian patients. Semin Avian Exot Pet 1995; 4(1): 23-31.
13. Lightfoot TL, Yeager JM. Pet bird toxicity and related environmental concerns. Vet Clin North Am Exot Anim Pract 2008; 11(2): 229-59.
14. Oglesbee B. Overview of avian cardiology. Western Veterinary Conference. February, 9-14, 2003; Las Vegas, Nevada-USA.
15. Pybus MJ, Hanson JA, Rippin B. The case of the killer cookies: apparent chocolate poisoning of gulls. CCWHC 1995; 3(3): 6.
16. Richardson J. Implications of toxic substances in clinical disorders. Harrison GJ, Lightfoot T, eds. In: Clinical Avian Medicine. Palm Beach (FL): Spix Publishing, 2006; pp. 711-9.
17. Sara MG. Treatment of chocolate toxicosis in a Mynah bird (a case report). Fourth International Veterinary Poultry Congress. February 16, 2014; Tehran-Iran.
18. Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K. Animal models for the study of adenosine receptor function. J Cell Physiol 2005; 202(1): 9-20.

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. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında 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) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlanmalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. 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, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgileri olarak belirtilmelidir.
14. Ondalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Systeme Internationale*)e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. 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. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**
19. Kaynaklar;
 - 19.1. Kaynak süreli yayın ise;
Örnek: Kaldhøne 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.
 - 19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;
Örnek: 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. Kaynak kitap ise;
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 19.4. Kaynak editörlü kitap ise;
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;
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.
 - 19.6. Kaynak tez ise;
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
 - 19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;
Örnek: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references.
4. Manuscripts should be sent to ercvet@gmail.com. For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 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 (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be placed in alphabetical order, punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, and the number for each reference in the text should be indicated in parentheses at the end of the relevant sentence. Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.**
19. References;
 - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;
Example: Kaldhone 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 reference 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 reference 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 reference is whole book with an editor, citation must be as below;
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. If the reference 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; Izmir-Türkiye.
 - 19.6. If the reference 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, Izmir-Turkey, 1993.
 - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;
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.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

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.