



July - 2019



# VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yuzuncu Yil Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

## Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

## Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT

Van YYU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu

Kampus / Van - Turkey

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27

e-mail: vfd@yyu.edu.tr

## Editors (Editorial Board)

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)

Prof. Dr. Handan MERT (Proof & Quality Editor)

Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)

Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Editor)

Assoc. Prof. Dr. Ozgur ISLEYICI (Editor)

Assist. Prof. Dr. Leyla MIS (Technical Editor)

Assist. Prof. Dr. Bekir OGUZ (Electronic Journal Editor)

Assist. Prof. Dr. Rabia Mehtap TUNCAY (Editor)

## Publication Board

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ali CINAR (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)

Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)

Prof. Dr. Berrin SALMANOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Ehab Abu-Basha (Irbid, JORDAN)

Prof. Dr. Gert W NIEBAUER (Vienna, Austria)

Prof. Dr. Gursel SONMEZ (Univ. of Uludag)

Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)

Prof. Dr. Hasan Huseyin HADIMLI (Univ. of Selcuk)

Prof. Dr. James M. MAY (Nashville, TN, USA)

Prof. Dr. Kamil EKICI (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Kemal Ozdem OZTABAK (Univ. of Istanbul)

Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI (Univ. of Kirikkale)

Prof. Dr. Nalan OZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Tevhide SEL (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Volkan AKYOL (Univ. of Uludag)

Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Yeter DEGER (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Hasan Huseyin ARI (Univ. of Cumhuriyet)

Assoc. Prof. Dr. Baris Atalay USLU (Univ. Of Cumhuriyet)

Assoc. Prof. Dr. Devrim S. AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Yildiray BASBUGAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Bahattin CAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Bahat COMBA (Univ. of Hitit)

Assist. Prof. Dr. Zeynep KARAPINAR (Univ. of Balikesir)

Assist. Prof. Dr. Selim CINAROGU (Univ. of Nigde Omer Halisdemir)

Assist. Prof. Dr. Kivanc IRAK (Univ. of Siirt)

Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

## Scientific Board of This Issue

Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif ERSOY)

Assoc. Prof. Dr. Yildiray BAŞBUĞAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Meriç Lütfi AVSEVER (Univ. of Aksaray)

Prof. Dr. Mustafa ATASEVER (Univ. of Ataturk)

Assist. Prof. Dr. Mustafa CELLAT (Univ. of Hatay Mustafa Kemal)

Assist. Prof. Dr. Tuncer ÇAKMAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Nihat DENEK (Univ. of Harran)

Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Musa GENÇCELEP (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Özlem ORUNÇ KILINÇ (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Oktay KESKİN (Univ. of Harran)

Assist. Prof. Dr. Leyla MİS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Nalan ÖZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Mehmet SAĞLAM (Univ. of Ankara)

Assoc. Prof. Dr. Sema USLU (Univ. of Cumhuriyet)

Assist. Prof. Dr. Semih YAŞAR (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Mehmet Akif YÖRÜK (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Mecit YÖRÜK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

This journal is published three times a year

All articles in this journal are available free of charge from <http://dergipark.gov.tr/vanveti>

Year	Volume	Issue
2019	30	2

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, DOAJ, Index Copernicus, TUBITAK-ULAKBIM, Türkiye Atif Dizini and Google Scholar



## The Effect of Different Levels of Molasses's Dried Sugar Pulp on the Quality of Alfalfa Silage

Bektaş Özgür YAKIŞIR<sup>1\*</sup> Taylan AKSU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adana Veterinary Control Institute, Toxicology Laboratory, Adana, Turkey

<sup>2</sup> Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, Van, Turkey

Received: 29.06.2018

Accepted: 21.11.2018

### ABSTRACT

In this study, the availability of dried sugar beet pulp with molasses at different rates (5% and 10% wet material) for quality of alfalfa silage production (MDSBP, containing 2% molasses) was investigated. For this purpose, laboratory silos of alfalfa which harvested at the beginning of the flowering period were prepared by adding molasses dry sugar beet pulp at different levels (0, 5 and 10%) on the basis of weight. As a result of scoring in terms of smell, appearance and color, alfalfa silage (control) was rated as "medium quality" while alfalfa + 5% MDSBP and, alfalfa + 10% MDSBP silages were rated as "good quality". The dry matter of silage increased significantly ( $P<0.001$ ) with the addition of the molasses dry sugar beet pulp. With increasing MDSBP level, crude protein, crude ash and acid detergent fiber amounts in silages decreased significantly ( $P<0.001$ ), there was no significant change in the amount of neutral detergent fiber; while the amount of organic matter increased significantly ( $P<0.001$ ). With the addition of MDSBP, the pH of alfalfa silages decreased significantly ( $P<0.001$ ). The lactic acid amounts of the silages increased significantly with increasing MDSBP addition. The highest amounts of lactic acid were found in alfalfa + 10% MDSBP group (293.98 mg kg<sup>-1</sup> in dry matter). It was determined that the MDSBP addition significantly reduced the levels of propionic acid and butyric acid. Also, the increased MDSBP level significantly reduced the ammonia-bound nitrogen levels of the silages compared to that of untreated alfalfa silage (24.80 mg kg<sup>-1</sup> dry matter) ( $P<0.001$ ). When the physical and chemical properties of alfalfa silage are considered, the addition of 10% MDSBP (2% molasses) to the alfalfa resulted in a higher silage quality of alfalfa silage.

**Keywords:** Molasses dried sugar beet pulp, Silage fermentation, Alfalfa silage

### ÖZ

## Farklı Seviyelerde Melashlı Kuru Şeker Pancarı Posası İlavesinin Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, kaliteli yonca silajı üretimi için değişik oranlarda (%0, %5 ve %10) melashlı kuru şeker pancarı posasının (MKŞPP, %2 melas ihtiva eden) kullanılabilirliği araştırıldı. Bu amaçla, çiçeklenme döneminin başlangıcında hasat edilen yoncaya, ağırlık esasına göre, farklı seviyelerde (%0, %5 ve %10) melashlı kuru şeker pancarı posası ilavesi yapılarak laboratuvarında cam kavanozlarda silolandı. Koku, dış görünüş ve renk bakımından yapılan puanlama sonucunda katkısız yonca silajı "orta kalite" olarak puanlanırken, yonca + %5 MKŞPP ve yonca + %10 MKŞPP silajları ise "iyi kalite" olarak puanlandı. Melashlı kuru şeker pancarı posası ilavesi ile silaj kuru maddesinin önemli derecede arttığı ( $P<0.001$ ) belirlendi. Silajlarda ham protein, ham kül ve asit detarjan lif miktarlarının artan MKŞPP ilavesi ile önemli derecede azaldığı ( $P<0.001$ ); Nötral deterjan lif miktarında önemli bir değişiklik olmadığı; organik madde miktarının ise önemli derecede arttığı belirlendi ( $P<0.001$ ). MKŞPP ilavesi ile yonca silajı pH'sının önemli derecede düştüğü belirlendi ( $P<0.001$ ). Silajların laktik asit miktarları, artan MKŞPP ilavesi ile önemli derecede artarken, en yüksek laktik asit miktarı, yonca + %10 MKŞPP silajında (293.98 mg kg<sup>-1</sup> KM ) tespit edildi. MKŞPP ilavesinin silajın amonyağa bağlı azot miktarlarını katkısız yonca silajına (24.80 mg kg<sup>-1</sup> KM) göre önemli derecede azalttığı belirlendi ( $P<0.001$ ). Yonca silajlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önüne alındığında yoncannın %10 düzeyinde MKŞPP (%2 melas içeren) katkısı ile silolanmasının yonca silajı kalitesini artırabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Melashlı kuru şeker pancarı posası, Silaj fermentasyonu, Yonca silajı

## GİRİŞ

Yonca rasyonların özellikle toplam lif ve protein miktarına sağladığı katkı sebebiyle süt ineklerinin rasyonlarında önemli bir yere sahiptir. Yüksek süt verimini sağlayabilmek için işletmelerde öncelikli olarak kaliteli yoncaya ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvanlara yedirinceye kadar yoncanın uygun olgunluk döneminde biçilmesi ve kalitesinin mutlaka korunması gereklidir. Kuru iklime sahip bölgelerde yonca, kurutulmuş iyi bir şekilde korunabilmektedir. Yapısında %20'den daha az su içerecek şekilde kurutulmuş ve depolanmış yonca kuru otu biyolojik olarak oldukça değişmezdir. Yoncada önemli besin madde kayıpları ve kalitesinde değişiklikler biçim esnasında oluşmaktadır. Nemli iklimlerde yonca hasadı ve sonrasında tarlada kurutma esnasında önemli yağmur hasarı riski bulunmaktadır. Bu riskleri azaltma adına yoncanın silajı yapılarak depolanması iyi bir yöntemdir. Yonca, silolanması zor bir yem maddesi olarak bilinmektedir. Bu zorluk temelde iki faktörden kaynaklanmaktadır. Birincisi yoncanın diğer kaba yemlere göre nispi olarak daha az karbonhidrat içermesi, ikincisi ise yüksek tampon kapasitesine sahip olmasıdır (Bujňák ve ark. 2011). Diğer bir ifade ile yonca pH düşüşüne dirençli bir bitkidir.

Son yıllarda üçüncü bir olumsuzluk olarak yonca bitkisindeki gerçek proteinlerin önemli bir kısmının silolanma esnasında protein niteliğinde olmayan çözünebilir azotlu bileşiklere yıkımlanabiliyor olması gösterilmektedir (Bujňák ve ark. 2011). Yem bitkilerinin silolanması iki temel şartın yerine getirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bunlar anaerobik çevre şartları ve düşük pH'dır. Silolama esnasında bu iki temel şart sağlandığında, laktik asit bakterilerinin üremesi etkinleştirilerek diğer bakterilere karşı egemenlik kurması sağlanmakta, oksijene bağımlı bozuşmaya sebebiyet veren bakterilerin gelişimi durdurulmaktadır (Bujňák ve ark. 2011). Diğer taraftan, düşük pH laktik asit bakterilerinin gelişimi ile sağlanır. Bu bakteriler birincil olarak bitkideki şekeri tüketir ve laktik asit ve/veya asetik asit ve etanol üretirler. Laktik asit, düşük pH'da asetik asitten daha güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir. Düşük pH, silo materyalinin korunmasında iki önemli etki gösterir. Birincisi, zararlı anaerobik bakterilerin gelişimini durdurmak, diğeri proteolitik etkiye sahip bitki enzimlerinin aktivitesini azaltmaktır. Yonca silajı fermantasyonunu güvence altına alabilmek için yonca silaja dışardan bazı katkı maddelerinin katılması zorunlu hale gelmektedir (Denek ve ark. 2011; Şakalar ve Kamalak 2016; Aksu ve ark. 2017). Bu amaçla, farklı katkı maddelerinden yararlanılmakla birlikte daha çok ortamda yetersiz düzeyde bulunan suda çözünebilir karbonhidrat açığını kapatmaya yönelik katkı maddelerinden yararlanılmaktadır (Canbolat ve ark. 2013; Acar ve Bostan 2016). Kaliteli yonca silajı elde edebilmek amacı ile kullanılacak silaj katkı maddelerinden birisi de melas ilavesi ile karbonhidrat içeriği yükseltmiş melaslı kuru şeker pancarı posasıdır (Karabulut ve Filya 2007; Şakalar ve Kamalak 2016).

Genellikle şeker pancarı posası kurutulurken %3 melas ilave edilmekte ve bu şekilde ticari olarak satışa sunulmaktadır. Melaslı kuru şeker pancarının besin madde değerleri; KM % 89, HP %10.1, HY % 0.6, HS %20.5, HK %6.1, Ca %0.61, MG %0.14, P %0.11, TDN %78 olarak bildirilmektedir (Feedstuff 1989). Biçim zamanı (çiçeklenme başlangıcı ve çiçeklenme sonu), soldurma (soldurulmamış ve soldurulmuş) ve suda çözünebilir karbonhidrat kaynağı (%5 melas, %10 arpa kırması ve %5 melas + %10 arpa kırması) kullanımının yonca silajı

kalitesi üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmada (Dumlugül ve ark. 2015), katkı maddesi kullanımının silajın pH ve NDF oranını düşürdüğü, kuru madde oranını, nispi yem değerini ve silaj kalite puanını arttırdığı bildirilmiştir. Biçim zamanının geciktirilmesinin silajın HP oranını düşürdüğü, NDF oranını yükselttiği; buna karşılık geç biçimlerde fermantasyonun daha başarılı olduğu, silaj pH'sının 5.60'tan 4.31'e düştüğü belirlenmiştir. Araştırma sonucunda yoncanın soldurularak ve melas+arpa kırması katkısı ile silolanmasının silaj kalitesini arttırmak için uygun bir yol olduğu bildirilmiştir. Çiçeklenme döneminde hasat edilmiş taze yoncaya 0, 40, 80, 120, 160 ve 200 g/kg KM düzeyinde katılan üzüm posasının, katılma düzeyine paralel olarak, silajların ham protein, ham kül, nötr deterjan lif (NDF) ve asit deterjan lif (ADF) içeriğini azalttığı; ham yağ, suda çözünebilir karbonhidrat ve toplam tanen içeriğini ise önemli derecede (P<0.05) arttırdığı belirlenmiştir (Canbolat ve ark. 2010). Diğer taraftan, Hashemzadeh-Cigari ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, taze (%20 KM) ve soldurulmuş (%37 KM) yoncaya farklı seviyelerde (0, 50 ve 100mg/kg KM) melas ilavesinin, soldurulmuş silajlarda her iki melas katkı seviyesinde; taze yoncada ise 100mg/kg KM melas katkı seviyesinde, silaj pH'sını önemli derecede düşürdüğü, soldurulmuş silajlarda her iki seviyedeki katkının da laktik asit seviyesini önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca soldurulmuş yonca silajında kolay eriyebilir karbonhidrat miktarının önemli derecede arttığı; NDF, ADF, amonyak ve asetat oranlarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, kaliteli yonca silajı üretimi için taze yonca materyaline %5 ve % 10 oranlarında kurutulmuş şeker pancarı posası ilavesinin (%2 melas ilaveli) kullanılabilirliğini araştırmaktır.

## MATERYAL ve METOT

### Silajların hazırlanması ve grupların oluşturulması

Araştırmada kullanılan yonca, çiçeklenme döneminin başlangıcında hasat edildi. Melaslı kuru şeker pancarı posası (%2 melas KM) piyasadan temin edildi. Ot doğrama makinesinde yaklaşık olarak 1-3 cm uzunluğunda doğranan yoncaya öğütme makinesinde kabaca öğütülen kurutulmuş melaslı şeker pancarı posası %0, %5 ve %10 oranında karıştırıldı. Karışımlar her birinden 5 tekrar olacak şekilde 1 lt'lik ağzı kapaklı cam kavanozlara 850 g ağırlık standardına göre sıkıştırılarak dolduruldu. Ağzı sıkıca kapatılan cam kavanozlar hava almayacak şekilde bantlanarak 45 gün süreyle ışık görmeyen bir odada fermantasyona bırakıldı.

### Fiziksel Gözlemler

Kırk beş gün sonunda kavanozlar açılarak alınan örneklerin fiziksel değerlendirilmesi (renk, strüktür ve koku) yapıldı. Fiziksel verilere dayalı bu değerlendirmelere göre silo yemleri; I=Peki-yi (16-20 puan), II=Memnuniyet verici (10-15 puan), III=Orta (5-9 puan) ve IV=Çok kötü (0-4 puan) gibi kalite sınıflarına ayrıldı (Alçiçek ve Özkan, 1997). Silajlara ait kuru madde ve pH değerleri belirlendikten sonra Fleig skorları belirlenerek, kalite sınıflandırılması yapıldı (Kılıç, 1986).

Fleig Puanı = [220 + (2 x KM (%)- 15)] - 40 x pH

### Analitik Yöntemler

Silaj örneklerinin pH değerleri dijital pH metre ile ölçüldü. Kuru madde (KM) düzeyi A.O.A.C (1990)'a göre 48 saat 60 °C sıcaklıktaki kurutma fırını ile, ham protein (HP) analizleri, Akyıldız (1984)'in bildirdiği Kjeldahl yöntemi ile Asit Deterjan Lif (ADF) ve Nötr Deterjan Lif (NDF)

analizleri ise Van Soest ve ark. (1991)'na göre ANKOM Fiber Analyzer cihazı ile yapıldı. Silajlarda uçucu yağ asitleri Leventini ve ark. (1990)'nın bildirdikleri yöntemle göre gaz kromatografi cihazında, laktik asit düzeyleri ise Petit ve Flipot (1992)'un bildirdiği yöntemle göre Sigma kitleriyle spektrofotometrede belirlendi.

### İstatistiksel analiz

Araştırmanın tüm istatistiksel analizleri SAS (The SAS System for Windows 9.0, 2002) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin analizlerinde tek yönlü varyans analizi, gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (Düzgüneş ve ark. 1983) kullanıldı.

## BULGULAR

Silajlık ham materyallerin ham maddelerinin besin madde içerikleri Tablo 1. de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Yonca ve melaslı kuru şeker pancarı posasının besin madde içerikleri,% (KM)

**Table 1.** Nutrients contents of alfalfa and molasses's dried sugar beet pulp, % (DM)

	Yonca	MKŞPP
<b>Besin Maddeleri</b>		
KM	21.11+	93.65
HK	11.82	5.80
OM	90.20	87.80
HP	18.96	10.24
ADF	33.44	27.27
NDF	37.66	39.07

+: Yaş Yonca Materyali, KM: Kuru madde (%), HK: Ham kül (%), OM: Organik madde (%), HP: Ham protein (%), ADF: Asit deterjan lif (%), NDF: Nötral deterjan lif (%)

**Tablo 2.** Melaslı kuru şeker pancarı posasının yonca silajının besin maddeleri ve kimyasal kompozisyonu (g kg<sup>-1</sup> KM) etkisi

**Table 2.** Effect of molasses's dried sugar beet pulp on nutrients and chemical composition of alfalfa silage (g kg<sup>-1</sup> DM)

	Yonca	Yonca+ %5 MKŞPP	Yonca+%10 MKŞPP	P<
<i>Besin maddeleri</i>				
KM	207.82±1.34c	240.55±2.05b	270.49±2.20a	0.000
HP	186.16±3.21a	180.474±1.36ab	177.72±2.87b	0.030
HK	122.47±1.29a	106.01±2.15b	95.83±1.10c	0.000
ADF	204.30±2.32a	194.69±5.49ab	189.38±2.99b	0.034
NDF	381.64±4.41	376.38±4.45	372.31±4.07	0.324
OM	76.50±2.66c	123.15±4.15b	172.72±2.75a	0.000
<i>Kimyasal kompozisyon</i>				
pH	4.98±0.06a	4.63±0.05b	4.47±0.02c	0.000
NH3N-TN*	24.80±1.14a	16.57±0.99b	14.66±0.26b	0.000
LA	153.44±6.00c	286.33±9.97b	293.98±3.65a	0.000
AA	150.20±5.34ab	163.10±4.65a	144.26±4.36b	0.039
PA	6.87±0.86a	3.11±0.17b	TE	-
BA	11.20±2.80a	8.00±0.38b	TE	-

a,b: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05). KM: Kuru Madde, HP: Ham Protein, HK: Ham Kül, NDF: Nötral Deterjan Lif, ADF: Asit Deterjan Lif, OM: Organik Madde, \* NH3N-TN: Toplam azot içerisinde amonyağa bağlı azot, %, LA: Laktik Asit, AA: Asetik Asit, PA: Propiyonik Asit, BA: Bütirik Asit, g/kgKM, TE: Tespit edilemedi



**Tablo 3.** Fiziksel özelliklerine göre silajların puanlaması ve kalite sınıflandırması**Table 3.** Scoring and quality classification of silages according to their physical properties

Gruplar	Koku	Puan (0-14)	Dış Görünüş	Puan (0-4)	Renk	(0-2)	Toplam Puan	Kalite sınıfı
Yonca	Az miktarda tereyağı asidi, kuvvetli ekşi koku ve hafif düzeyde kızılaşma	7	Yoncanın yapısı çok az bozulmuş	3	Rengini koruyor	2	12	Orta
Yonca+%5MKŞPP	Az miktarda tereyağı asidi ve ekşi koku	10	Yoncanın yapısı bozulmamış	4	Rengini koruyor	2	16	İyi
Yonca+%10MKŞPP	Az miktarda tereyağı asidi, hafif ekşimsi, meyvemsi hoş kokulu	11	Yoncanın yapısı bozulmamış	4	Rengini koruyor	2	17	İyi

**Tablo 4.** Silajların Fleig Puanına göre kalite sınıflandırması**Table 4.** Quality classification of silages according to Fleig score

Gruplar	KM, %	pH	Fleig Puanı	Kalite Sınıfı
Yonca	20.78c	4.98a	47.44c	Orta
Yonca + %5 MKŞPP	24.06b	4.63b	67.83b	İyi
Yonca + %10 MKŞPP	27.05a	4.47c	80.22a	Pekiyi
P	0.000	0.000	0.000	

a,b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

Fiziksel özelliklerine göre silajların puanlaması ve kalite sınıflandırması Tablo 3'te sunuldu. Koku, dış görünüş ve renk bakımından yapılan puanlama sonucunda yonca silajı "orta kalite" olarak puanlanırken, yonca + %5 MKŞPP ve yonca + %10 MKŞPP silajları "iyi kalite" olarak puanlandı. Silajların Fleig Puanına göre kalite sınıflandırması ise Tablo 4'te sunuldu. Silajlara ait KM ve pH değerleri kullanılarak elde edilen Fleig puanı, yonca silajında %47.44 olarak belirlenirken, Yonca + %5 MKŞPP ve Yonca + %10 MKŞPP silajlarında sırası ile %67.83 ve 80.22 olarak belirlendi. Artan MKŞPP ilavesi Fleig Puanını önemli derecede artırırken (P<0.001), kalite sınıflandırmasına da sırası ile "orta", "iyi" ve "pekiyi" olarak yansıdı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

İyi kaliteli yonca silajı üretebilmek amacı ile taze yonca materyaline %5 ve %10 düzeyinde melaslı kuru şeker pancarı posası (%2 melas KM) ilavesi yapılan bu çalışmadan elde edilen yonca silajının besin madde ve kimyasal kompozisyonuna etkisine ilişkin değerler Tablo 4'de verilmiştir. Buna göre melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesi yonca silajının besin madde ve kimyasal kompozisyonunu önemli derecede etkilemiştir (P<0.001). Silajlara ait kuru madde içeriği yonca, yonca + %5 MKŞPP ve yonca + %10 MKŞPP silajlarında sırasıyla %20.78, %24.06 ve %27.05 olarak belirlenmiştir. Yonca silajının kuru madde içeriği MKŞPP'nin katkı miktarına bağlı olarak artmıştır (P<0.001). Bu artışın nedeni MKŞPP'nin kuru madde miktarının (%93.65) taze yoncanın kuru maddesine göre (%21.11) çok daha yüksek olmasındandır (Tablo 1). Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda, kuru maddece zengin kimi katkı maddelerinin kullanılması ile yonca silajının kuru madde içeriğinin yükselebileceği bildirilmiştir (Rajabi ve ark., 2016; Aksu ve ark., 2017).

Nitekim Şakalar ve Kamalak (2016), melaslı kuru şeker pancarı posasının yonca silajı kalitesine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, çiçeklenme döneminde hasat edilen yoncaya % 0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 6.0 oranlarında melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesinin yonca silajının besin madde içeriği ve kimyasal kompozisyonunu önemli derecede değiştirdiğini; silajların kuru madde, Fleig skoru, toplam gaz üretimi, metabolik enerji ve in vitro organik madde sindirilme derecesinin MKŞPP ilavesi ile arttığını bildirmişlerdir (P<0.001). Mevcut çalışmada, silajların ham protein düzeylerinin 177.72-186.16 g kg<sup>-1</sup> KM arasında değiştiği (P<0.05); en yüksek ham protein düzeyine (186.16 g kg<sup>-1</sup> KM) katkısız yonca silajının sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Yonca silajının ham protein miktarı, ilave edilen melaslı kuru şeker pancarı posası düzeyine bağlı olarak azalmıştır. Taze yoncanın ham protein düzeyine (%18.96) göre daha düşük düzeyde ham protein içeren MKŞPP'nin (%10.24) silaj ham protein miktarını azaltması şeklinde izah edilebilecek bu durum (Tablo 2) önceki benzer çalışmaların sonuçları ile uyum içerisindedir (Hashemzadeh-Cigari ve ark. 2011; Acar ve Bostan., 2016, Aksu ve ark., 2017). Şakalar ve Kamalak (2016), %17.71 oranında ham protein içeren taze yonca materyaline, %8.94 oranında ham protein içeren MKŞPP katkısı ile yaptıkları yonca silajlarında, MKŞPP'nin tüm katılma oranlarında (%1.5, 3.0, 4.5 ve 6.0), yonca silajının ham protein oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir (P<0.001). Benzer şekilde Acar ve Bostan (2016), değişik doğal katkı maddelerinin yonca silajı kalitesine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, farklı iki seviyede şeker pancarı melası, arpa ezmesi ve peynir altı suyu tozu ilavesi ile yapılan yonca silajlarının ham protein oranlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir (P<0.05). Mevcut çalışmada melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesinin yonca silajının ham kül içeriğini düşürdüğü belirlenmiştir (P<0.001) (Tablo 2).

En yüksek ham kül miktarı katkısız yonca silajında (122.47 g kg<sup>-1</sup> KM); en düşük ham kül miktarı ise taze yoncaya %10 MKŞPP ilave edilen silajda (95.83 g kg<sup>-1</sup> KM) tespit edilmiştir (P<0.001). Silajlık materyallerin besin maddeleri incelendiğinde (Tablo 1), yoncaya (%11.82) kıyasla MKŞPP'nın ham kül oranının (%5.80) düşük olduğu görülmektedir. Dolayısı ile artan MKŞPP oranına bağlı olarak silajların ham kül miktarında gözlenen düşüş, silaj katkı maddesi olarak kullanılan MKŞPP'nın ham kül içeriğinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda, ham kül bakımından düşük kimi katkı maddelerinin kullanılması ile yonca silajının ham kül içeriğinin azalabileceği bildirilmiştir (Rajabi ve ark., 2016). Şakalar ve Kamalak (2016), %10.88 oranında ham kül içeren taze yonca materyaline, %4.58 oranında ham kül içeren MKŞPP katkısı ile ürettikleri yonca silajlarında, MKŞPP'nın tüm katılma oranlarında (%1.5, 3.0, 4.5 ve 6.0), yonca silajının ham kül oranının düştüğünü tespit etmişlerdir (P<0.001).

ADF miktarı, kaba yemlerin sindirilme derecesi hakkında bilgi veren önemli bir ölçüttür. ADF miktarı düşük yemlerin sindirilme derecesi yüksektir. Mevcut araştırmada, MKŞPP ilavesinin yonca silajının ADF miktarını önemli derecede düşürdüğü (P<0.001); yonca, yonca + %5 MKŞPP ve yonca + %10 MKŞPP silajlarında sırasıyla %20.43, %19.46 ve %18.93 oranında olduğu belirlenmiştir. MKŞPP katkısına paralel olarak silaj ADF miktarında gözlenen düşüş, ADF bakımından fakir silaj katkı maddelerinin yonca silajının ADF miktarını düşürdüğünü bildiren literatürler ile uyumludur (Kamalak ve ark. 2012, Kamalak ve ark. 2014, Şakalar ve ark. 2016). NDF değeri, ADF fraksiyonu ile birlikte hemiselülozdan oluşan toplam hücre duvarıdır. NDF miktarı, hayvanın tüketebileceği yem miktarını yansıtır. NDF yüzdeleri arttıkça, rumendeki sindirimi daha uzun süren lif içeriğinin artması nedeniyle hayvanlar genellikle daha az yem tüketirler. Mevcut araştırmada MKŞPP ilavesinin yonca silajının NDF miktarını istatistiksel olarak etkilemediği, rakamsal bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. MKŞPP organik madde bakımından zengin bir yemdir (%87.8). Bu nedenle taze yonca ile silolandığında, yonca silajının OM miktarını artırması beklenen bir sonuçtur. Mevcut araştırmada, silajlara ait OM miktarının sırası ile 76.50, 123.15 ve 172.72 mg kg<sup>-1</sup> KM olduğu; artan MKŞPP ilavesine paralel olarak silajların OM içeriğinin de önemli derecede arttığı belirlenmiştir (P<0.001). Bu bulgular Şakalar ve ark., (2016)'nın bildirişleri ile uyum içerindedir. Silaj pH'sı ve amonyak azotu, silaj fermantasyon kalitesinin önemli göstergelerindedir. Silaj pH'sı, silaj asiditesini ve dolayısıyla fermantasyon derecesini gösterir. Kaliteli silaj için daha düşük pH tercih edilir. pH değeri, KM içeriği % 35'ten az olan silajlar için silaj fermantasyon kalitesinin doğrudan bir göstergesi olarak da kabul edilebilir. Kötü korunmuş silajlarda protein fraksiyonu büyük oranda parçalanır, bu nedenle yüksek amonyak-N (toplam azotun% 'si) zayıf fermantasyona işaret eder. Toplam azotun < % 10'u seviyeleri iyi fermantasyona işaret eder. Mevcut araştırmada silaj gruplarında pH, sırasıyla 4.98, 4.63 ve 4.47 olarak belirlenmiş, MKŞPP'nın artan katkı seviyelerine paralel olarak silaj pH'sı önemli derecede düşmüştür (P<0.001). Bu düşüşünün en önemli nedeni silolama sırasında laktik asit üretimindeki artıştır. MKŞPP, laktik asit üretiminden sorumlu olan laktik asit bakteriler için önemli besin maddesi olan şeker bakımından zengindir. Bu nedenle MKŞPP, silajların laktik asit üretimine katkı sağlayarak silaj pH'sını düşürmüştür. Silajların LA seviyelerindeki artış da bu yorumu destekler niteliktedir. Diğer taraftan silajlara ait NH3-N-TN oranları

incelendiğinde (Tablo 2), MKŞPP ilavesinin yonca silajında protein bileşenlerinin yıkılmalarını önemli derecede düşürdüğü görülmektedir (P<0.001). MKŞPP ilaveli yonca silajlarında NH3-N-TN miktarının sırası ile %16.57 ve 14.66 ile katkısız yonca silajına göre (%24.80) önemli derecede düşük olduğu ve silaj kalitesini arttırdığı belirlenmiştir. pH, LA ve NH3-N-TN değerleri bakımdan yoncaya MKŞPP ilavesi ile yapılan silajlarda, silaj fermantasyonunun iyileştiği sonucuna varılmıştır. Kolay eriyebilir karbonhidrat bakımından zengin kimi silaj katkı maddeleri ile yapılan çalışma bulguları da bu doğrultudadır. Hashemzadeh-Cigari ve ark. (2011), taze veya soldurulmuş yoncaya 50 ve 100mg/kg melas ilavesinin her iki formda da silaj pH'sı ve NH3-N-TN miktarını düşürdüğünü ve LA miktarını arttırdığını ifade etmişlerdir. Diğer taraftan, tanen ve karbonhidrat içeriği zengin Galıçya meyvesinin silaj katkı maddesi olarak kullanıldığı bir çalışmada (Canbolat ve ark. 2013), yonca silajının LA miktarının arttığı; pH ve NH3-N-TN miktarının ise azaldığı bildirilmiştir.

Laktik asit, iyi kaliteli silajlarda birincil asit olmalıdır. Bu asit, diğer silaj organik asitlerinden (asetik, propiyonik ve bütirik) daha güçlüdür ve genellikle silaj pH'sındaki düşüşten doğrudan sorumludur. Mevcut silajların LA miktarları incelendiğinde, MKŞPP ilavesinin silajların LA miktarını önemli derecede arttırdığı (P<0.001) tespit edilmiştir. MKŞPP'nın şeker içeriğinin yüksek olması, LAB sayısını ve laktik asit üretim potansiyelini arttırmış, dolayısı ile silajların LA miktarları da artmıştır. Bu bulgular kolay eriyebilir karbonhidratça zengin silaj katkı maddelerinden beklenen bir sonuçtur ve önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Khadem ve ark., 2009; Kamalak ve ark. 2012).

Yonca silajına bu amaçla katılan mısır (Öztürk ve ark., 2006) ve melasın (Hashemzadeh-Cigari ve ark. 2011), yonca silajının LA miktarını önemli derecede arttığı bildirilmiştir. Asetik asit miktarı, MKŞPP ilavesinden etkilenmiştir (P<0.05). Özellikle %10 düzeyinde katılan MKŞPP'nın diğer gruplara göre asetik asit miktarını önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Silajlarda asetik asit miktarının düşmüş olması, silaj ağırlıklı beslenen ruminantlarda silaj tüketimini arttırması bakımından bir avantaj olarak değerlendirilmektedir (Kamalak ve ark., 2012). Diğer taraftan MKŞPP ilavesinin PA ve BA miktarlarını önemli derecede düşürdüğü de tespit edilmiştir (P<0.001). Silaj fermantasyon kalitesi bakımından olumlu olarak değerlendirilebilecek bu durum, özellikle %10 MKŞPP katkılı silajlarda BA'in tespit edilemeyecek seviyeye inmiş olmasından dolayı daha belirleyici olmuştur. Arpa unu ilave edilen (250g kg<sup>-1</sup> KM) yonca silajının ilave taze ve soldurulmuş yonca silajına göre PA ve AA miktarını önemli derecede düşürdüğü ve silaj fermantasyon kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Khadem ve ark., 2009).

Fiziksel özelliklerine göre silajların puanlaması ve kalite sınıflandırması Tablo 3'te sunulmuştur. Katkısız yonca silajının fiziksel özelliklerine göre aldığı puanın 12; kalite sınıflandırmasının ise "orta" olduğu belirlenmiştir. Artan MKŞPP miktarına bağlı olarak silajların toplam puanının ve kalite sınıflandırmasının arttığı; her iki MKŞPP katkı seviyesinde de silajların "iyi" kaliteli olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, silajların Fleig puanına göre kalite sınıflandırılmasında Yonca, Yonca + %5 MKŞPP ve Yonca + %10 MKŞPP silajlarında fleig puanlarının sırasıyla 47.44, 67.83 ve 80.22 olduğu; MKŞPP katkısının fleig puanını önemli derecede iyileştirdiği (P<0.05); fleig puanına göre silajların kalite sınıflandırmasının ise aynı sırayla "orta, iyi ve pekiyi" olduğu belirlenmiştir.

MKŞPP'nin silajların fermantasyon parametrelerine olan katkısının fiziksel özelliklere yansımaları olarak değerlendirilen bu ölçütler, silaj fermantasyon parametreleri yanında fiziksel özellikler ve fleig puanı bakımından da MKŞPP ilavesinin kaliteli yonca silajı üretimine imkan sağladığını göstermektedir (Tablo 4). Yonca silajına %10 düzeyinde MKŞPP ilavesi, elde edilen yonca silajı kalitesini "iyi kalite" olarak sınıflandırmıştır. Benzer şekilde Şakalar ve Kamalak (2016), çiçeklenme döneminde hasat edilen yoncaya %0, 1.5, 3.0,4.5 ve 6.0 oranlarında MKŞPP ilavesi ile yaptıkları çalışmada, silajlara ait fleig skorlarının önemli derecede arttığını (P<0.001); katkısız yonca silajına göre (22.35) en yüksek fleig skorunun %6.0 MKŞPP ilavesi yapılan yonca silajında (68.80) belirlendiğini ifade etmişlerdir.

Sonuç olarak; melaslı kuru şeker pancarı posası (%2 melas ihtiva eden) ilavesi ile yonca silajının kuru madde miktarının önemli miktarda arttığı; melas katkısı ile artan kolay eriyebilir karbonhidrat miktarının laktik asit üretimi için gerekli olan fermantasyonu iyileştirerek silajların laktik asit miktarını da arttırdığı gözlenmiştir. Kaliteli silaj elde etmek için yem bitkilerinin kuru madde miktarları ile suda çözünebilir karbonhidrat içeriklerinin uygun ve yeterli olması gerekmektedir. Taze yonca bitkisinde bir dezavantaj gibi görünen bu yetersizlikler melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesi ile giderilebilmekte ve kaliteli yonca silajı elde edilebilmektedir. Nitekim silajların fiziksel özelliklerine göre puanlaması ve kalite sınıflandırması ile silajların fleig puanına göre kalite sınıflandırması sonuçları da taze yoncanın melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesi ile kolay ve başarılı bir şekilde silolanabileceğini göstermektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'nca 2015-SBE-YL330 nolu proje olarak desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- AOAC (1990)**. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 15th edn. Washington DC.
- Acar Z, Bostan M (2016)**. Değişik doğal katkı maddelerinin yonca silajının kalitesine etkilerinin belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bil Derg*, 31, 433-440.
- Aksu T, Denek N, Aydın SS, Doğan Daş B, Savrunlu M, Özkaya S (2017)**. Kuru kekik posasının çayır ve yonca silajının fermantasyon kalitesi ve in vitro madde sindirilebilirliğine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23, 2, 211-217.
- Akyıldız R (1984)**. Yemler Bilgisi Laboratuvar Kılavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 895, Uygulama Kılavuzu: 312, Ankara.
- Alççek A, Özkan K. (1997)**. Silo Yemlerinde Fiziksel ve Kimyasal Yöntemlerle Silaj Kalitesinin Saptanması. Türkiye Birinci Silaj Kongresi, 241-246, Bursa.

- Bujiňák L, Maskařová I, Vajda V (2011)**. Determination of buffering capacity of selected fermented feedstuffs and the effect of dietary acid-base status on ruminal fluid pH. *Acta Vet. Brno*, 80, 269-273
- Canbolat Ö, Kalkan H, Filya İ (2013)**. Yonca silajlarında katkı maddesi olarak Gladiya meyvelerinin kullanılma olanakları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 2, 291-297.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ (2010)**. Üzüm posasının yonca silajlarında karbonhidrat kaynağı olarak kullanma olanakları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 2, 269-276.
- Denek N, Can A, Avci M, Aksu T, Durmaz H (2011)**. The effect of molasses-based pre-fermented juice on the fermentation quality of first-cut lucerne silage. *Grass and Forage Sci*, 66, 243-250.
- Dumlugül Z, Tan M, Fayetörbay Kaynar D, Kharazmi K (2015)**. Bazı katkı maddeleri, biçim zamanı ve soldurmanın yonca silajı kalitesi üzerine etkileri. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 46, 2, 113-118.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1983)**. İstatistik Metotları I, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 861, Ankara.
- Feedstuffs (1989)**. Molasses Beet Pulp Pellets, 1989, <https://www.westernsugar.com/products/co-products/molasses-beet-pulp-pellets/> Erişim Tarihi: 25 Mart 2018.
- Hashemzadeh-Cigari F, Khorvash M, Ghorbani GR, Taghizadeh A (2011)**. The effect of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerna silage. *S Afr J Anim Sci*, 41, 2, 377-388.
- Kamalak A, Özoğul F, Çalışlar S, Canbolat Ö (2012)**. Silaj katkı maddesi olarak tanen ekstratının(Artutan) yonca silajının kalite özellikleri ile koyunlarda yem tüketimi sindirim derecesi ve rumen fermantasyonu üzerine etkisi. Tubitak Proje No.1100397 Kesin Rapor, TUBİTAK, Ankara.
- Kamalak A, Şahin M, Canbolat Ö (2014)**. Silaj katkı maddesi olarak tanen ekstratının(Artutan) yonca silajının kalite özellikleri ile koyunlarda yem tüketimi sindirim derecesi ve rumen fermantasyonu üzerine etkisi. Tubitak Proje, Kod. 1001, No.1110821, Kesin Rapor, TUBİTAK, Ankara.
- Karabulut A, Filya İ (2007)**. Yemler Bilgisi ve Yem Teknolojisi. 4. Basım, Ders Notları No:67, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bursa.
- Khadem AA, Sharifi M, Afzalzadeh A, Rezaeian M (2009)**. Effects of diets containing alfalfa hay or barley flour mixed alfalfa silage on feeding behavior, productivity, rumen fermentation and blood metabolites in lactating cows. *Anim Sci J*, 80, 4, 403-410.
- Kılıç A (1986)**. Silo Yemi Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri, İzmir.
- Leventini MW, Hunt CW, Roffler RE, Casebolt DG (1990)**. Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. *J Anim Sci*, 68, 4334-4344.
- Ozturk D, Kizilsimsek M, Kamalak A, Canbolat O, Ozkan CO (2006)**. Effects of ensiling alfalfa with whole-crop maize on the chemical composition and nutritive value of silage mixtures. *Asian-Aust J Anim Sci*, 19, 4, 526-532.
- Petit HV., Flipot PM., 1992**. Source and feeding of nitrogen on growth and carcass characteristics of beef steers feed grass as hay or silage. *J Anim Sci*, 70, 867-875.
- Rajabi R, Tahmasbi R, Dayani O, Khezri A (2016)**. Chemical composition alfalfa silage with waste date and it's feeding effect on ruminal fermentation characteristics and microbial protein synthesis in sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 101, 3, 466-474.
- Şakalar B, Kamalak A (2016)**. Melaslı kuru şeker pancarı posasının yonca bitkisinin silolanmasında kullanılması. *Anadolu Tarım Bilim Derg*, 31, 157-164.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis D (1991)**. Methods of dietary fiber neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 7, 3583-3597.



## Antibacterial Activity of Muscid and Myiasis Flies Larval Secretions

Aykut ZERЕК<sup>1</sup> Mehmet YAMAN<sup>1</sup> Feyzullah GÜÇLÜ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Hatay, Turkey

<sup>2</sup> Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Konya, Turkey

Received: 05.07.2018

Accepted: 14.11.2018

### ABSTRACT

Maggot therapy is a method based on the use of myiasis fly larvae also called maggot which affinity necrotic tissue in wound treatment. In this study, it was aimed to determine the antibacterial activity some muscid and myiasis flies larvae secretions in vitro. In this study, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* and *Musca domestica* flies caught and placed in the cage to provide feeding and laying. After disinfected the eggs was transferred to sterile medium including sheep blood agar (5 %) and incubated overnight at 25 °C. After hatched, larvae were kept in the medium for 2-3 days and disinfected, incubated overnight at 25 °C in steril bi-distilled water (ddH<sub>2</sub>O). After incubation, the liquid which containing larval secretions, centrifuged and sterilized by filtration (0.2 µm) that bacteria could not pass through. *Staphylococcus aureus*, MRSA ATCC 43300, *E. coli* and *P. aeruginosa* the suspension of bacteria spreaded petri dishes including MHA sterile-medium. Secretions amount of 30 µl obtained from larvae was impregnated blank antibiotic discs and were placed in the MHA medium and then incubated overnight at 35 °C. When the results were examined, antibacterial activity were not detected against Gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa* bacterial strains at the larval secretions of muscid and myiasis flies, antibacterial activity was detected against Gram-positive *S. aureus* bacterial strain. While antibacterial activity was not detected against Gram-positive MRSA ATCC 43300 bacterial strain the larval secretion of muscid fly, antibacterial activity were detected the larval secretions of myiasis flies. In conclusion, the antibacterial activities of muscid and myiasis fly larval secretions were showed and it is suggested that studies regarding this field can be investigated by using different method and medium.

**Keywords:** Maggot therapy, Muscid and Myiasis, Larvae, Secretion, Antibacterial activity

### öz

### Muskid ve Miyaz Sinekleri Larva Salgılarının Antibakteriyel Etkileri

Maggot terapi, nekrotik dokulara affinite duyan maggot adı da verilen miyaz sinek larvalarının yara tedavisinde kullanımına dayalı bir metottur. Bu çalışmada, bazı muskid ve miyaz sinek larvalarından elde edilen salgıların in vitro ortamda antibakteriyel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* ve *Musca domestica* sinekleri yakalanarak beslenmeleri ve yumurtlamaları sağlanmak için kafes düzeneğine konuldu. Elde edilen yumurtalar dezenfekte edildikten sonra % 5 koyun kanlı agar steril besi ortamına aktarılarak bir gece boyunca 25 °C'de inkübe edildi. Yumurtadan çıktıktan sonra besi ortamında 2-3 gün bekletilen larvalar dezenfekte edilerek steril bidistile su (ddH<sub>2</sub>O) içerisinde 25 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra larva salgılarını içeren sıvı santrifüj edilip bakterilerin geçemeyeceği 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. *Staphylococcus aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar (MHA) steril besi ortamı bulunan petri kutularına yayıldı. Boş antibiyotik disklerine 30 µl miktarında emdirilen larva salgıları MHA besiyerine konuldu ve 35 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar incelendiğinde muskid ve miyaz sinekleri larva salgılarında Gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilemezken, Gram-pozitif *S. aureus* bakteri suşuna karşı antibakteriyel etki tespit edildi. Gram-pozitif MRSA ATCC 43300 bakteri suşuna karşı ise miyaz sinekleri larva salgılarında antibakteriyel etki tespit edilirken, muskid sinek larva salgısında antibakteriyel etki tespit edilemedi. Sonuç olarak, muskid ve miyaz sinek larva salgılarının antibakteriyel etkileri gösterilmiş olup, konuyla ilgili çalışmaların farklı metot ve besiyerleri kullanılarak karşılaştırmalı çalışılmasında yarar görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Maggot terapi, Muskid ve Miyaz, Larva, Salgı, Antibakteriyel etki

## GİRİŞ

Bazı miyaz sinek larvaları fakültatif parazitlik yaparlar. Hayvanlardaki yaralar üzerinde beslenirken irritasyona ve yangiya neden olurlar. Böylece hayvanlarda iştahsızlık, huzursuzluk, kilo kaybı, anemi gibi birçok sağlık problemi meydana getirirler (Zumt 1965; Soulsby 1986; Kettle 1990).

Maggot adı da verilen miyaz larvaları zararlı etkilerinin dışında Adli Tıpta ölüm zamanı ve yerini belirlemede, insan hekimliğinde ise antibiyotiklere dirençli iyileşmeyen yaraların tedavisinde yaygın kullanılmaktadır (Sherman ve ark. 2000). Nekrotik dokulara affinite duyan miyaz larvalarının veya salgılarının kullanıldığı bu tedavi metoduna maggot terapi adı verilir (Sherman ve ark. 2013). Larva salgılarının antibakteriyel etkilerine dair in vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda çoğunlukla *Lucilia sericata* larva salgıları tercih edilmiştir (Bonn 2000; Kerridge ve ark. 2005; Jaklic ve ark. 2008; Polat ve Kutlubay 2014).

Bu çalışmada, Muscidae ailesinde yer alan *Musca domestica* ile Calliphoridae ailesinde yer alan *L. sericata*, *Chrysomya albiceps* ve *Calliphora vicina* larvalarından elde edilen salgıların *Staphylococcus aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteri suşlarına in vitro antibakteriyel etkileri araştırıldı.

## MATERYAL ve METOT

Hatay'ın Antakya ilçesinde *L. sericata*, *Ch. albiceps*, *C. vicina* ve *M. domestica* sinekleri mezbaha ve balık pazarında yakalandıktan sonra 30x30x45 ebadında tülle kaplanmış kafeslere konuldu. Kafeslerin içerisine sineklerin beslenmeleri için % 20 şeker solüsyonu konuldu. Yumurtlamayı uyarmak amacıyla Calliphorid sinekler için sığır karaciğeri, *M. domestica* için kayısı, domates gibi çürümüş organik maddeler kullanıldı.

Kerridge ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışma modifiye edilmek suretiyle planlanan çalışmada elde edilen yumurtalar % 5'lik formaldehit ile dezenfekte edildikten sonra % 5'lik koyun kanlı agar steril besi ortamına aktarıldı. Bir gece 25 °C'de inkübe edilerek larvaların yumurtadan çıkmaları sağlandı. Besi ortamında 2-3 gün bekletilerek üçüncü dönemin başına gelmiş larvalar elde edildi.

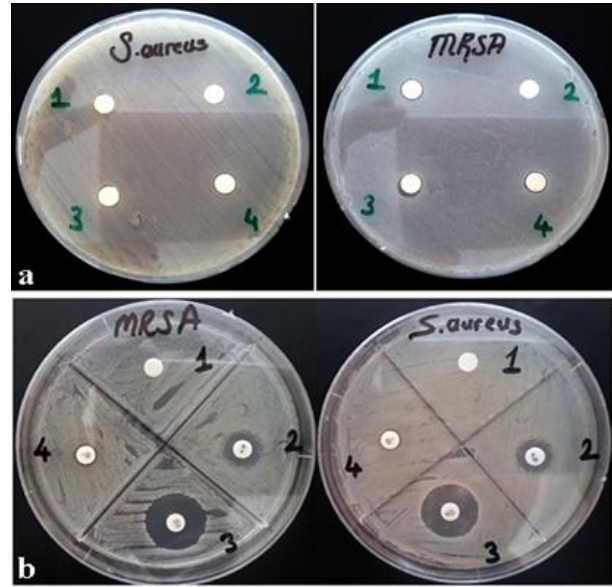
Dezenfeksiyonu yapılan 200 larva 10 ml steril bidistile su (ddH<sub>2</sub>O) içerisine konularak salgılarını elde etmek amacıyla 25 °C'de bir gece bekletildi. Larva salgılarını içeren sıvı santrifüj edildikten sonra bakterilerin geçemeyeceği 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

Mueller Hinton Agar (MHA) steril besi ortamlarına *S. aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri süspansiyonları yayıldı. Larvalardan elde edilen salgılar boş antibiyotik disklerine 30 µl miktarında emdirilip MHA besiyerine konularak 35 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Kerridge ve ark. 2005).

Bir gece sonra inhibisyon zonlarının gözlemlendiği alanların çapları disk zonu çapı da dâhil olacak şekilde petri kutusunun tersinden cetvelle ölçülerek antibakteriyel etki belirlendi. Ayrıca inhibisyon zonu oluşan bakteri suşları için negatif ve pozitif kontrol testi yapıldı. Negatif kontrol için boş antibiyotik diskleri kullanılırken, pozitif kontrol için penisilin (10 µg, PV), vankomisin (30 µg, VA), oksitetrasiklin (1 µg, OT) antibiyotik diskleri kullanıldı (Şekil 1b).

## BULGULAR

Muskid ve miyaz sineklerine ait larva salgılarında Gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilemezken, Gram-pozitif *S. aureus* ve Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilerek (Şekil 1a) sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** a) 1) *L. sericata*, 2) *M. domestica*, 3) *Ch. albiceps*, 4) *C. vicina* sinek larva salgılarının *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkilerinin MHA besiyerinde disk difüzyon yöntemiyle gösterilmesi, b) *S. aureus* ve Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 suşlarına karşı negatif ve pozitif kontrolün disk difüzyon yöntemiyle gösterilmesi; 1) Boş antibiyotik diski, 2) Penisilin (10 µg, PV), 3) Vankomisin (30 µg, VA), 4) Oksitetrasiklin (1 µg, OT).

**Figure 1.** a) 1) Antibacterial activity against *S. aureus* of *L. sericata*, 2) *M. domestica*, 3) *Ch. albiceps*, 4) *C. vicina* fly larvae secretions demonstration by disk diffusion method in MHA medium, b) Negative and positive control against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 strains demonstration by disc diffusion method; 1) Blank antibiotic disc, 2) Penicillin (10 µg, PV), 3) Vancomycin (30 µg, VA), 4) Oxytetracycline (1 µg, OT).



**Tablo 1.** Antibakteriyel etki test sonuçları**Table 1.** Antibacterial activity test results

<b>Sinek Türleri</b>	<b>Bakteri Türleri</b>			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA ATCC 43300
<i>L. sericata</i>	(-)	(-)	6.5 mm	7.5 mm
<i>M. domestica</i>	(-)	(-)	6.5 mm	(-)
<i>Ch. albiceps</i>	(-)	(-)	6.5 mm	7.5 mm
<i>C. vicina</i>	(-)	(-)	6.5 mm	7.5 mm

(-): inhibisyon zonu oluşmadı

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Maggot terapi uygulanan bir hastanın yarısından alınan *L. sericata* larva salgılarını da içeren total vücut sıvısının *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür (Doğandemir 2010). Bu çalışmada *L. sericata* ile diğer sineklerin larva salgılarında *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etki gözlenmezken, *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki tespit edildi. Bu sonucun larva salgısı elde etmede kullanılan yöntemin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

*Lucilia sericata* larvalarının in vitro ortamda *S. aureus* ve *Pseudomonas* türlerine etkili olduğu, buna karşın *E. coli* türlerine çok az etki gösterdikleri bildirilmiştir (Bonn 2000). Bu çalışmada *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında *S. aureus*'a karşı tespit edilen antibakteriyel etki *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı gözlenmemiş, *P. aeruginosa* dışında bu çalışmaya benzer sonuçlar alınmıştır.

Bexfield ve ark. (2004), *L. sericata* larva salgılarının in vitro ortamda MRSA'ya ve *E. coli*'ye antibakteriyel etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada hem *L. sericata* hem de *Ch. albiceps*, *C. vicina* larva salgılarında MRSA ATCC 43300'e karşı antibakteriyel etki tespit edilmiş ve bu açıdan Bexfield ve ark. (2004) çalışmalarıyla paralellik göstermiştir. Ancak *E. coli*'ye karşı *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarının antibakteriyel etki göstermemesinin nedeni çalışmada kullanılan larva sayısının ve yöntemin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Jaklic ve ark. (2008), *L. sericata* larva salgılarının antibakteriyel etkisini, katı Brain Heart Infusion Agar (BHIA)'da denemişler fakat olumlu sonuç elde edememişlerdir. Aynı deneyi sıvı BHI'da tekrarladıklarında ise *S. aureus* üremesinin tamamen inhibe olduğunu, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise sınırlı bir inhibisyon zonu oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında katı MHA besiyerinde *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki tespit edilmiş ve bu açıdan Jaklic ve ark. (2008) çalışmalarıyla benzerlik göstermiştir. Ancak *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında antibakteriyel etki tespit edilemedi. Kullanılan besiyerlerinin farklılığı, katı veya sıvı olması bu durumun nedeni olabilir.

Kerridge ve ark. (2005), MRSA ve *P. aeruginosa*'ya karşı *L. sericata* larva salgılarının antibakteriyel etkilerini iso-sentitest agar katı besiyerinde denediklerinde bakterilerin üremelerini inhibe etmek suretiyle kısıtlı bir etki oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada MHA besiyerinde MRSA ATCC 43300'e karşı *L. sericata*, *Ch.*

*albiceps*, *C. vicina* larva salgılarının gösterdiği antibakteriyel etki bahsedilen çalışmayla paralellik göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı ise sinek larva salgılarının hiçbirinde antibakteriyel etki tespit edilememiştir. Bu durum larva salgılarının antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinde kullanılan besiyerlerinin farklı olmasından ileri gelmiş olabilir.

Bu çalışmada *L. sericata* larva salgılarının Gram-negatif bakterilere nazaran Gram-pozitif bakteriler üzerinde daha fazla inhibisyon etkisi oluşturması ilgili literatürlerle (Bonn 2000; Kerridge ve ark. 2005; Jaklic ve ark. 2008) paralellik göstermiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, larva salgılarının eldesinde araştırmacıların farklı yöntemler izledikleri görülmüştür. Farklı sayıda larva kullanılması, besiyerlerinin katı veya sıvı olması, salgıların antibakteriyel etkilerinin değerlendirilmesinde disk difüzyon veya mikrodüzyon yöntemlerinin kullanılması bu farklılıklardan bazılarıdır. Bu sebepten dolayı konuyla ilgili standardize edilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, her bir sinek türünden 200 larva kullanılarak yapılan bu çalışmada muskid ve miyaz sinek larva salgılarının çeşitli bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etkileri gösterilmiş olup, konuyla ilgili çalışmaların farklı metod ve besiyerleri kullanılarak karşılaştırmalı çalışılmasında yarar görülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 15110 nolu proje ile desteklenmiştir. Antibakteriyel etkinin belirlenmesi kısmında yardımlarından ötürü Prof. Dr. Özkan Aslantaş'a ve Doç. Dr. Zafer Canteğin'e teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA, (2004). Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect*, 6, 1297-1304.
- Bonn D, (2000). Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet*, 356, 1174.
- Doğandemir G, (2010). *Lucilia sericata*'nın Kronik Yaralarda Kolonize Olan Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Askeri Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, Ankara.
- Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N, (2008). Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*, 57 (5), 617 - 625.
- Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR, (2005). Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol*, 19, 333-337.

**Kettle DS, (1990).** Medical and Veterinary Entomology. CAB International, Wallingford.

**Polat E, Kutlubay Z, (2014).** Meglümün Antimoniat Tedavisine Dirençli Dört Kutanöz Leishmaniosis Olgusu. *Turkiye Parazitol Derg*, 38, 177-80.

**Sherman RA, Grassberger M, Gileva OS, Kim CMH, Mumcuoğlu KY (Editors), (2013).** Biotherapy - History, Principles and Practice, Springer Science+Business Media Dordrecht.

**Sherman RA, Hall MJ, Thomas S, (2000).** Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*, 45, 55-81.

**Soulsby EJL, (1986).** Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere Tindall, London.

**Zumpt F, (1965).** Myiasis in man and animals in the old world. Butterwoths & Co. ltd. London.





## Effect of Acute Acrylamide Administration in PTZ Induced Convulsions in Mice

Semih YAŞAR<sup>1</sup> Gökhan OTO<sup>2</sup> Özlem Ergül ERKEÇ<sup>3</sup> Ersoy ÖKSÜZ<sup>2</sup> Okan ARIHAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Van Yüzüncü Yıl University, Vocational High School of Ozalp, Department of Medical Laboratory Technics, Van, Turkey

<sup>2</sup> Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Van, Turkey

<sup>3</sup> Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Van, Turkey

Received: 12.10.2018

Accepted: 23.05.2019

### ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder which causes seizures. Epilepsy treatment is conducted with administration of antiepileptic drugs. Acrylamide is a chemical substance which is used for manufacturing, drainage treatment, cosmetics and laboratory studies. It can also be found in potato chips or French fries, infant formulas, beer, biscuits and cookies due to heating of carbohydrates at certain degrees. This study was conducted to assess effect of acute acrylamide administration on epileptic seizures in mice. 36 female Swiss-albino mice were separated into 6 groups. Acrylamide was administered via i.p. route. Groups A5 and A10 were administered with only 5 and 10mg/kg acrylamide respectively. PA5 and PA10 groups received five days of both 5 and 10mg/kg acrylamide respectively and also administered 80mg/kg(i.p.) pentylenetetrazol(PTZ) at the end of the 5th day. Control group was administered with saline. PTZ group was administered solely with 80mg/kg(i.p.) PTZ. Results show no convulsions or any tremor due to lone acrylamide administration in myoclonic convulsions. Results reveal a significant reduction in time required for myoclonic convulsions in PA5(15.5s) and in PA10(15.7s) groups compared to PTZ(62.3s) groups. Time required for tonic-clonic convulsion period was also significantly lowered in PA5(19.3s) and PA10(21s) groups compared to PTZ(267s). Present study suggests a proconvulsive effect of acrylamide on PTZ induced convulsions. Studies concerning diets of epilepsy patients are required to evaluate its relevance in human subjects.

**Keywords:** Epilepsy, Convulsion, Anticonvulsive, Acrylamide, Seizure, Pentylenetetrazol

### öz

### Farelerde PTZ Kaynaklı Konvülsiyonlarda Akut Akrilamid Uygulamasının Etkisi

Epilepsi nöbetlere neden olan nörolojik bir hastalıktır. Epilepsi tedavisi antiepileptik ilaçlarla yapılmaktadır. Akrilamid, üretim sanayinde, atık su sistemlerinde, kozmetikte ve laboratuvar çalışmalarında kullanılan kimyasal bir maddedir. Akrilamid aynı zamanda patates cipsi ve kızartmasında, bebek ürünlerinde, birada, bisküvilerde ve kurabiyelerde karbonhidratların belli derecelerin üzerinde ısıtılmasıyla ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışma akrilamidin farelerde epileptik nöbetlere etkisini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. 36 adet dişi Swiss-albino fare 6 gruba ayrıldı. Akrilamid i.p. yolla verildi. Grup A5'e 5 ve grup A10'a 10mg/kg akrilamid 5 gün boyunca verildi. PA5 ve PA10 gruplarına hem 5 gün boyunca 5 ve 10mg/kg akrilamid hem de 5.günün sonunda 80mg/kg i.p. pentilentetrazol(PTZ) verildi. Kontrol grubuna serum fizyolojik verildi. PTZ grubuna sadece 80mg/kg i.p. PTZ verildi. Sonuçlar tek başına uygulanan akrilamidin herhangi bir nöbet ya da titremeye neden olmadığını gösterdi. PA5(15.5s) ve PA10(15.7s) gruplarında PTZ(62.3s) gruplarına göre miyoklonik nöbete girmek için gereken sürede anlamlı azalma gözlemlendi. Tonik-klonik nöbete girme süresinde de PA5(19.3s) ve PA10(21s) gruplarında PTZ(267s) grubuna göre anlamlı kısalma gerçekleşti. Bu çalışma akrilamidin PTZ ile indüklenen nöbetler üzerindeki prokonvülsif etkisini göstermektedir. Bu sonuçların insanlardaki karşılığının değerlendirilebilmesi için epilepsi hastalarının diyetleri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Epilepsi, Konvülsiyon, Antikonvulsif, Akrilamid, Nöbet, Pentilentetrazol

### INTRODUCTION

Epilepsy is a common neurological disease which occurs in brain with uncontrolled electrical activity. It causes seizures which is decreasing life quality of patients and

even may be lethal in serious cases. It is encountered in different forms including generalized, absence, focal, myoclonic types. Medical treatment of epilepsy is via administration of antiepileptic drugs which avoids or alleviates convulsions. Epilepsy can be triggered by

exposure to rapid flash lights, hyperventilation, hunger, fatigue or some chemicals such as organophosphates (Pearson and Patel 2016).

Some plant based compounds may also aggravate epileptic symptoms and act as a proconvulsive substance. *Salvia officinalis* L. is known to increase synaptic transmission via inhibiting acetylcholine esterase (Kennedy et al. 2006) and acting as proconvulsive in epilepsy patients. Etiology of epilepsy includes trauma, infectious diseases and genetic predisposition. Current findings reveal that oxidative stress is also a counterpart of this disease (Waldbaum and Patel 2010). Antioxidant level of epileptic patient blood is lower than healthy people suggesting the imbalance in oxidants and antioxidants in such patients (Sudhaa et al. 2001). In addition, continuation of an antiepileptic therapy decreases oxidant status (Morimoto et al. 2017). These findings are supported with animal studies. Hassanzadeha et al (Hassanzadeha et al. 2017) found that administration of Ferulic acid causes antiepileptogenic effect and avoids oxidative stress in kindled rats. Other plant originated substances also revealed similar results which reveal a decrease in oxidative stress parameters is correlated with attenuated convulsive activity (Katara and Ganachari 2001; Gupta et al. 2003).

Acrylamide is a chemical substance which is used in different applications in laboratory science and also manufacturing processes. Among many uses its polymer namely polyacrylamide has many applications such as drainage treatment, cosmetic and fabric production. Its polymer, polyacrylamide is an important component in laboratory studies (Friedman 2003). However foods can be another unintended source of acrylamide apart from industrial production. It is formed due to heating of carbohydrates at certain degrees which is known as Maillard browning (Demirok Soncu and Kolsarici 2017). Potato chips or French fries, infant formulas, beer, biscuits and cookies are rich sources of acrylamide (Stadler et al. 2002).

Acrylamide was blamed for different untoward effects in organisms. It binds to DNA but since this binding is on the sugar side it is classified as "potential" carcinogen. It binds to hemoglobin as an adduct (Sumner et al. 2003) and decreases erythrocyte deformability which is an important parameter for proper functioning of erythrocytes (Arihan et al. 2011). Its effects on neurological system are also investigated. Both acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide are reported as neurotoxic.

Acrylamide neurotoxicity was shown in different animal models from *Drosophila melanogaster* (Muralidhara 2012) to cats (Kuperman 1958). Acrylamide affects potassium channels thereby changing channel function and cause alterations in neuronal conductivity (Bentzena et al. 2006). Acrylamide is thought to interact with neuronal proteins and affects nerve terminals mainly (LoPachin 2002; LoPachin 2004). Acrylamide causes oxidative stress in nervous system (Zhu et al. 2008) and also in liver, kidney, brain and testes by increasing lipid peroxidation and altering activities of superoxide dismutase and Glutathione-S-Transferase (Yousef and El-Demerdash 2006) and in intestinal cells by attenuating reduced glutathione (Zödl et al. 2007).

This study aims to assess effect of acute acrylamide administration on PTZ induced epileptic convulsions in mice.

## MATERIALS and METHODS

### Animals

Prior to experiments an ethical permission was obtained from Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Ethical Committee. All administrations were conducted according to Helsinki Declaration. Swiss albino female mice weighing 25-40 grams were used. Humidity (55±15%) and temperature (24±2°C) were kept constant in a 12h dark and light cycle. All experiments were conducted between 9:00 to 12:00 a.m.

### Drugs

The following drugs were used; Pentylenetetrazol (PTZ) (Sigma) 80mg/kg and acrylamide (Sigma) at 5 and 10 mg/kg. Drugs were dissolved in saline and were administered intraperitoneal (i.p.) in a volume of 10 ml/kg of body weight. Control group was administered with saline.

### Acrylamide dosage

There exist different dosage and administration schemes in literature from micrograms to 40 mg/kg (Alturfan et al. 2012), oral or i.p. and from 5 days (Husain et al., 1987) to longer chronic administrations. We have administered it in 5 days and at 5 and 10 mg/kg doses.

### Experimental procedure

36 female mice were separated into 6 groups. Number of animals were decided according to result of previous studies and with the permission of ethical committee. Acrylamide was administered via i.p. route.

Groups A5 and A10 were administered with only 5 and 10 mg/kg acrylamide respectively. PA5 and PA10 groups received five days of both 5 and 10 mg/kg acrylamide respectively and also administered 80mg/kg i.p. PTZ at the end of the 5<sup>th</sup> day. Control group was administered with saline. PTZ group was administered solely with 80 mg/kg i.p. PTZ. PTZ is a commonly used chemical for inducing convulsions in animal models (Loscher, 2011). In this study PTZ test is used to assess any pro/anticonvulsive effect of acrylamide.

Time required for first myoclonic and tonic-clonic convulsion and duration of the latter were recorded. Increase in latency of start of both convulsion types are accepted as anticonvulsive effect and vice versa. In addition number of ex animals due to tonic-clonic convulsions was also recorded. An attenuation of number of ex animals shows anticonvulsive activity or vice versa.

### Statistical analysis

All data are expressed as the mean±SEM. Data were analyzed with Kruskal-Wallis and Tukey tests. Statistical significance is set to  $P<0.05$ .

## RESULTS

Following i.p. PTZ injection, all animals showed myoclonic convulsions in PA5, PA10 and PTZ groups. In myoclonic convulsions, results revealed a significant reduction in time required for myoclonic convulsions in PA5 (15.5s) and in PA10 (15.7s) groups compared to PTZ (62.3s) group (Table 1).

Time required for tonic-clonic convulsion period was also significantly lowered in PA5 (19.3s) and PA10 (21s) groups compared to PTZ (267s) (Table 1). No significant difference between those groups was observed and this finding shows no dose dependent response between 5 and 10 mg/kg of acrylamide.

**Table 1.** Effect of different administrations on the PTZ-induced convulsions in Mice

Treatment	MCC(s)	TCC(s)	C (s)	N of TCC	N of Ex
Control	-	-	-	-	-
PTZ	62.3±5.5 <sup>a</sup>	248.2±48.0 <sup>a</sup>	11.0±1.4	6/6	6/6
A5	-	-	-	-	-
A10	-	-	-	-	-
PA5	15.5±2.2 <sup>b</sup>	19.5±1.2 <sup>b</sup>	12.5±1.8	6/6	6/6
PA10	15.7±0.3 <sup>b</sup>	21±0.9 <sup>b</sup>	12.7±0.5	6/6	6/6

Results are presented as mean±S.E.M. MCC: Latency for myoclonic convulsions, TCC: Latency for tonic-clonic convulsions, PTZ: Pentylentetrazol, A5: 5 days of i.p. 5mg/kg acrylamide group, A10: 5 days of i.p. 10mg/kg acrylamide group, PA5: 5 days of i.p. acrylamide 5mg/kg+last day 80 mg/kg PTZ group, PA10: 5 days of i.p. acrylamide 10 mg/kg+last day 80 mg/kg PTZ group. C: Convulsion period in seconds, N of TCC: Number of animals having tonic clonic convulsions, N of Ex: Number of Ex animals due to tonic-clonic convulsions. Significance:  $P < 0.05$ . Statistically homogenous subsets are given in same letters as a, b.

## DISCUSSION

Epilepsy is a common neurological disease which is induced by various reasons. Certain diet ingredients or toxins may also cause convulsions or exert proconvulsive effect. On the other hand some of the toxins inhibit seizures such are Botulinum toxin (Lee et al., 2017). Acrylamide is well known for its neurotoxic properties and this study was conducted to test its pro/anticonvulsive nature. No deaths or morbidity were occurred due to acrylamide administration during study period. Results also show no convulsions or any tremor in lone acrylamide administration this period. In literature convulsions due to acrylamide were observed by Kuperman (Kuperman, 1958) when administered in doses close to lethal dose. Therefore in accordance with the initial expectation no convulsion was observed in our study at 5 and 10 mg/kg dosage (A5 and A10 groups). Present study may suggest a possible proconvulsive effect of acrylamide on PTZ induced convulsions due to acrylamide administration. It may act as a proconvulsive diet ingredient also in human epileptic patients.

## ACKNOWLEDGEMENT

Authors would like to thank Sevgi Yuksek for her help during experimental procedures.

## REFERENCES

- Alturfan AA, Tozan-Beceren, Sehirli AO, et al. (2012). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep*, 39, 4589–4596.
- Arihan O, Seringec, NB, Gurel EI, et al. (2011). Effects of oral acrylamide intake on blood viscosity parameters in rats. *Clin Hemorheol Micro*, 47, 45-52.
- Bentzena BH, Schmitta N, Calloea K, et al. (2006). The acrylamide (S)-1 differentially affects Kv7 (KCNQ) potassium channels. *Neuropharmacology*, 51, 1068–1077.
- Demirok Soncu E, Kolsarici N (2017). Microwave thawing and green tea extract efficiency for the formation of acrylamide throughout the production process of chicken burgers and chicken nuggets. *J Sci Food Agr*, 97, 1790–1797.
- Friedman M (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agr Food Chem*, 51, 4504–4526.
- Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK (2003). Effect of Centella asiatica on pentylentetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 74, 579–585.
- Hassanzadeha P, Arbabic E, Atyabia F, et al. (2017). Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. *Life Sci*, 179, 9–14.

Husain R, Dixit R, Das M, Seth PK. (1987). Neurotoxicity of acrylamide in developing rat brain: Changes in the levels of brain biogenic amines and activities of monoamine oxidase and acetylcholine esterase. *Ind Health*, 25, 19-28.

Katara SS, Ganachari MS (2001). Effect of Centella asiatica on hypoxia induced convulsions and lithium-pilocarpine induced status epilepticus and antilipid peroxidation activity. *Ind J Pharmacol*, 33, 128.

Kennedy DO, Pace S, Haskell C, Okello EJ, Milne A, Scholey AB (2006). Effects of Cholinesterase Inhibiting Sage (*Salvia officinalis*) on Mood, Anxiety and Performance on a Psychological Stressor Battery. *Neuropsychopharmacol*, 31, 845-52.

Kuperman AS (1958). Effects of acrylamide on the central nervous system of the cat. *J Pharmacol Exp Ther*, 123, 180-192.

Lee WI, Carneya PW, Hughesa AJ, Archer JS (2017). Refractory focal motor seizures controlled with intramuscular botulinum toxin. *Epilepsy Res*, 133, 93–97.

LoPachin RM (2004). The Changing View of Acrylamide Neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 5, 617–630.

LoPachin RM, Ross JF, Lehnin EJ (2002). Nerve Terminals as the Primary Site of Acrylamide Action: A Hypothesis. *Neurotoxicology*, 23, 43-59.

Loscher W (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20, 359–368.

Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, Kyotani S (2017). A study of oxidative stress and the newer antiepileptic drugs in epilepsy associated with severe motor and intellectual disabilities. *J Chinese Med Assoc*, 80, 19–28.

Muralidhara SNP (2012). Evidence of acrylamide induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* – Its amelioration with spice active enrichment: Relevance to neuropathy. *Neurotoxicology*, 33, 1254–1264.

Pearson JN, Patel M (2016). The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann Ny Acad Sci*, 1378, 17-24.

Stadler RH, Blank I, Vorga N, Robert F, Hau J, Guy PA, et al. (2002). Acrylamide from reaction products. *Nature*, 419, 449–50.

Sudhaa K, Ashalatha VR, Raoc A (2001). Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta*, 303, 19–24.

Sumner SC, Willams CC, Snyder RW, et al. (2003). Acrylamide: A Comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol Sci*, 75, 260–270.

Waldbaum S, Patel M (2010). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 88, 23-45.

Yousef MI, El-Demerdash FM (2006). Acrylamide induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 219, 133–41.

Zhu YJ, Zeng T, Zhu Y-B, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, et al. (2008). Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res*, 33, 2310–17.

Zödl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T, et al. (2007). Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology*, 232, 99–108.





## The Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria Isolated from Bovine Mastitis

Dilek ÖZTÜRK Özlem ŞAHAN YAPICIER Ezgi ŞABABOĞLU  
 Mehmet KAYA Faruk PEHLIVANOĞLU Hülya TÜRÜTOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Burdur, Turkey

Received: 10.01.2019

Accepted: 27.05.2019

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the antibiotic susceptibility of Gram negative bacteria isolated from milk samples of cows with mastitis that were brought to Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Microbiology Laboratory between 2013 and 2018. A total of 1687 milk samples were cultured on blood agar and MacConkey agar. While 1708 microorganisms were isolated from 1352 milk samples, no any microorganisms were isolated from 335 samples. Isolation and identification of bacteria was made by conventional bacteriological methods and 151 (8.84%) of these bacteria were detected to be Gram negative. *Escherichia coli*, which constitutes 54.30% (82/151) of the Gram negative isolates, was the most isolated bacterium. Other Gram negatives were identified to be 17.88% *Klebsiella pneumoniae*, 7.95% *Pseudomonas aeruginosa*, 7.95% *Citrobacter* sp., 5.30% *Pasteurella* sp., 2.64% *Enterobacter* sp., 1.99% *Proteus* sp., 0.66% *Flavobacter* sp., 0.66% *Alcaligenes faecalis* and 0.66% *Actinobacillus* sp. *In vitro* resistance of these bacteria against to 9 antibiotics was determined by disk diffusion test. Over all 96.69% of the Gram negatives were found resistant to cloxacillin, 96.03% to erythromycin, 76.16% to oxytetracycline, 70.86% to amoxicillin, 54.97% to trimethoprim+sulfamethoxazole, 54.30% to gentamicin, 47.68 % to cefoperazone, 45.03% to amoxicillin+clavulanic acid and 29.80%, to enrofloxacin. All Gram-negative bacteria were resistant to at least two antibiotics, except for *E. coli* and *Pasteurella* sp. isolates. As a result, it was determined that *E. coli* was the most isolated Gram negative bacterium from bovine mastitis cases in Burdur province, followed by *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. and *Citrobacter* sp., due to the differences in antibiotic resistance profiles of Gram-negative bacteria, the treatment should be done according to antibiotic susceptibility test results.

**Keywords:** Mastitis, Gram Negative Bacteria, Antibiotic Resistance

### ÖZ

### Mastitisli İneklerden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Antibiyotik Dirençlilikleri

Bu çalışmada, 2013-2018 yılları arasında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilen mastitisli ineklere ait 1687 süt örneğinden izole edilen Gram negatif bakterilerin mastitis tedavisinde kullanılan 9 antibiyotiğe karşı *in vitro* dirençlilik durumlarının belirlenmesi amaçlandı. Kanlı agar ve MacConkey Agar'a ekimleri yapılan süt örneklerinin 1352'sinden 1708 mikroorganizma izole edilirken, 335 örnekten izolasyon yapılamadı. Konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonları yapılan etkenlerin 151 (%8.84)'i Gram negatif bakteri olarak belirlendi. *Escherichia coli*, Gram negatifler içinde en fazla izole edilen bakteri %54.30 (82/151) oldu. İzole edilen diğer Gram negatif bakterilerin %17.88'i *Klebsiella pneumoniae*, %7.95'i *Pseudomonas aeruginosa*, %7.95'i *Citrobacter* sp., %5.30'u *Pasteurella* sp., %2.64'ü *Enterobacter* sp., %1.99'u *Proteus* sp., %0.66'sı *Flavobacter* sp., %0.66'sı *Alcaligenes faecalis* ve %0.66'sı *Actinobacillus* sp. olarak tanımlandı. Gram negatif bakterilerin %96.69'u kloksasiline, %96.03'ü eritromisine, %76.16'sı oksitetrasikline, %70.86'sı amoksisiline, %54.97'si trimetoprim sulfametoksazole, %54.30'u gentamisine, %47.68'i sefoperazona, %45.03'ü amoksisilin klavulanik asite, ve %29.80'i enrofloksasine dirençli bulundu. *E.coli* ve *Pasteurella* sp. izolatları hariç, Gram negatif bakterilerin en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. Sonuç olarak; Burdur ilinde mastitisli sütlerden izole edilen Gram negatif bakteriler içinde *E. coli*'nin ilk sırayı aldığı, bunu *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Citrobacter* sp.'nin takip ettiği, Gram negatif bakterilerin antibiyotiklere dirençliliklerindeki farklılıklar nedeniyle tedavinin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yapılması gerektiği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Mastitis, Gram negatif bakteri, Antibiyotik direnç

## GİRİŞ

Mastitis, tüm dünyada süt sığırcılığı işletmelerinin en önemli problemlerinden biridir. Süt veriminin azalması, süt kalitesinin bozulması, mastitisli sütlerin atılması, ilaç ve veteriner hekim giderlerinin fazla olması nedeniyle büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Aydın ve Paracıkoğlu 2006; Sabuncuoğlu ve Çoban 2006).

Mastitise neden olan birçok etken tanımlanmasına rağmen, en fazla stafilocok ve streptokok türleri ile *Escherichia coli*'nin izole edildiği bildirilmiştir (Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Mastitis etkenleri, kaynakları ve bulaşma şekillerine göre bulaşıcı ve çevresel patojenler olarak iki kısımda incelenmektedir (Costa ve ark. 1998; Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Sığırlarda mastitise yol açan *Streptococcus agalactiae* dışındaki tüm streptokoklar, Gram negatif bakteriler ve diğer mikroorganizmalar çevresel patojenler olarak tanımlanmıştır (Costa ve ark. 1998; Ak 2000; Hogan ve Smith 2003; Schukken ve ark. 2012).

Çevresel patojenlerden koliform bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella* sp. ve *Enterobacter* sp.) sığırlarda mastitise neden olan en önemli Gram negatif bakteriler olarak tanımlanmış (Costa ve ark. 1998; Silva ve Costa 2001; Hertl ve ark. 2010; Schukken ve ark. 2012), *Serratia*, *Pseudomonas* ve *Proteus* gibi bakterilerin de mastitise neden olabileceği bildirilmiştir (Hogan ve Smith 2003; Tel ve ark. 2009; Schukken ve ark. 2012). Çevresel Gram negatif patojenlerden kaynaklanan mastitis vakalarına daha az sıklıkla rastlanıldığı, ancak sağaltımlarının zor olması yanında septisemi ve toksemiye de sebep olmaları nedeniyle önemli oldukları bildirilmiştir (McLennan ve ark. 1997; Costa ve ark. 1998; Ribeiro ve ark. 2008; Schukken ve ark. 2012).

Sığırları mastitisten korumak ve tedavi etmek amacıyla sıklıkla antibiyotikler kullanılmaktadır (McLennan ve ark. 1997; Ribeiro ve ark. 2008; Ahmed ve Shimamoto 2011; Dinç ve ark. 2012; Hinthong ve ark. 2017). Mastitis tedavisinde gelişigüzel ve sık antibiyotik kullanımının dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve yayılmasına yol açtığı ve ayrıca dirençli bakterilerden dirençlilik genlerinin diğer bakterilere aktarılması sonucu gelişen dirençli bakteri popülasyonları nedeniyle tedavide zorluklarla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Ahmed ve Shimamoto 2011; Dinç ve ark. 2012; Hinthong ve ark. 2017).

Bu çalışmada; Burdur ilinde mastitis şüpheli ineklerden alınarak Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilen süt örneklerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin mastitis tedavisinde kullanılan 9 antibiyotiğe karşı direnç durumlarını ortaya koymak amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

### Süt Örnekleri

Çalışmada Ocak 2013-Aralık 2018 yılları arasında mastitis şüpheli ineklerden alınan ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen 1687 süt örneğinden yararlanıldı.

### Bakteriyolojik Kültür

Süt örneklerinden % 5 koyun kanlı agar (Oxoid) ve MacConkey agar'a (Oxoid) ekimler yapıldı ve petriyer 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda oluşan koloniler Gram boyama metodu ile boyandı ve Gram negatif bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonları yapıldı (Winn ve ark. 2006).

## Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık testi Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile Müller-Hinton agar'da Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2013) kriterlerine uygun olarak yapıldı. Test amacıyla amoksisilin klavulanik asit (AMC, Oxoid, 30 µg), amoksisilin (AX, Oxoid, 25 µg), sefoperazon (CFP, Oxoid, 75 µg), gentamisin (CN, Oxoid, 10 µg), eritromisin (E, Oxoid, 15 µg), enrofloksasin (ENR, Oxoid, 5 µg), kloksasilin (OB, Oxoid, 5 µg), oksitetrasiklin (OXY, Oxoid, 30 µg) ve trimetoprim/sulfametoksazole (SXT, Oxoid, 25 µg) diskleri kullanıldı.

## BULGULAR

Süt örneklerinin 1352'sinden 1708 mikroorganizma izolasyonu yapılırken, 335 örnekte izolasyon yapılmadı. İzole edilen mikroorganizmaların 151 (% 8.84)'inin Gram negatif bakteri olduğu belirlendi. Süt örneklerinden en fazla izole edilen Gram negatif bakteri *E. coli* (% 54.30) olarak saptandı. İzole edilen diğer Gram negatifler ve oranları Tablo1'de verildi.

**Tablo 1.** Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Gram negatif bakteriler

**Table 1.** Gram negative bacteria isolated from bovine milk samples with mastitis

İzole Edilen Mikroorganizmalar	Sayı (n)	Oranı (%)
<i>E. coli</i>	82	54.30
<i>K. pneumoniae</i>	27	17.88
<i>P. aeruginosa</i>	12	7.95
<i>Citrobacter</i> sp.	12	7.95
<i>Pasteurella</i> sp.	8	5.30
<i>Enterobacter</i> sp.	4	2.64
<i>Proteus</i> sp.	3	1.99
<i>A. faecalis</i>	1	0.66
<i>Flavobacter</i> sp.	1	0.66
<i>Actinobacillus</i> sp.	1	0.66
<b>TOPLAM</b>	<b>151</b>	<b>100</b>

İzole edilen Gram negatif bakterilerin mastitis tedavisinde kullanılan 9 antibiyotiğe dirençlilikleri belirlendi. Buna göre; Gram negatiflerin %96.69'u kloksasiline, %96.03'ü eritromisine, %76.16'sı oksitetrasikline, %70.86'sı amoksisiline, %54.97'si trimetoprim-sulfametoksazole, %54.30'u gentamisine, % 47.68'i sefoperazona, % 45.03'ü amoksisilin klavulanik asite ve %29.80'i enrofloksasine dirençli bulundu. Mastitisli sütlerden en fazla izole edilen *E. coli* izolatlarının %98.78'i eritromisin ve kloksasiline, %73.17'si amoksisiline, % 50'si gentamisine dirençli bulundu. İzole edilen diğer Gram negatif bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının farklı oranlarda olduğu belirlendi (Tablo2). *E. coli* ve *Pasteurella* sp. izolatları hariç, sütlerden izole edilen Gram negatif bakterilerin, en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. *K. pneumoniae*, *Citrobacter* sp. ve *Enterobacter* sp. izolatlarının 2, *P. aeruginosa*, *Proteus* sp. ve *Actinobacillus* sp. izolatlarının 3 ve *A. faecalis* ve *Flavobacterium* sp. izolatlarının ise 6 antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı (Tablo 2).

**Tablo 2.** Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Gram negatif bakteriler ve antibiyotik dirençlilikleri**Table 2.** The antibiotic resistance and Gram negative bacteria isolated from bovine milk samples with mastitis

İzolatlar (n=150)	AMC		AX		CFP		CN		E		ENR		OB		OXY		SXT	
	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
<i>E. coli</i> (n=82)	37	45.12	60	73.17	38	46.34	41	50	81	98.78	19	23.17	81	98.78	62	75.61	32	39.02
<i>K.pneumoniae</i> (n=27)	9	33.33	16	59.26	12	45.25	14	51.85	27	100	8	29.63	27	100	19	70.37	19	70.37
<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	7	58.33	8	66.67	6	50	5	41.67	12	100	5	41.67	10	83.33	12	100	12	100
<i>Citrobacter</i> sp.(n=12)	9	75	10	83.33	10	83.33	11	91.67	12	100	9	75	12	100	11	91.67	10	83.33
<i>Pasteurella</i> sp. (n=8)	2	25	5	62.5	4	50	7	87.5	3	37.5	2	25	7	87.5	3	37.5	5	62.5
<i>Enterobacter</i> sp.(n=4)	0	0	3	75	0	0	3	75	4	100	0	0	4	100	3	75	0	0
<i>Proteus</i> sp. (n=3)	2	66.67	3	100	2	66.67	1	33.33	3	100	2	66.67	2	66.67	3	100	2	66.67
<i>A. faecalis</i> (n=1)	1	100	1	100	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100	1	100	1	100
<i>Flavobacter</i> sp.(n=1)	1	100	1	100	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100	1	100	1	100
<i>Actinobacillus</i> sp. (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100
<b>Toplam (151)</b>	<b>68</b>	<b>45.03</b>	<b>107</b>	<b>70.86</b>	<b>72</b>	<b>47.68</b>	<b>82</b>	<b>54.30</b>	<b>145</b>	<b>96.03</b>	<b>45</b>	<b>29.80</b>	<b>146</b>	<b>96.69</b>	<b>115</b>	<b>76.16</b>	<b>83</b>	<b>54.97</b>

(AMC: amoksisilin klavulanik asit, AX: amoksisilin, CFP: sefoperazon, CN: gentamisin, E:eritromisin ENR: enrofloksasin, OB: kloksasilin, OXY: oksitetrasiklin, SXT: trimetoprim/sulfametoksazol)



## TARTIŞMA ve SONUÇ

Gram negatif bakterilerin yol açtığı klinik mastitisler, nadiren görülmesine karşın, tedavisinin zor olması, septisemi ve toksemiden dolayı ölümlere yol açması nedeniyle büyük öneme sahiptir (Ak 2000). Yapılan çalışmalarda mastitisli sütlerden izole edilen Gram negatif bakteriler içinde en fazla *E. coli*, *Klebsiella* sp. ve *Enterobacter* sp.'nin izole edildiği, diğer Gram negatif bakterilerin de mastitise neden olabilecekleri bildirilmiştir (Costa ve ark. 1998; Türütoğlu ve ark. 1995; Gürtürk ve ark. 1998; Turutoglu ve ark. 2002; Gülcü ve Ertaş 2004; McConnen ve ark. 2005; Tel ve ark. 2009). Türkiye'de ve dünyada yapılan çalışmalarda mastitisli süt örneklerinde *E. coli* izolasyon oranının % 4.8 ile % 11.57 arasında değiştiği, *E. coli*'nin en sık izole edilen Gram negatif olduğu bildirilmiştir (Gürtürk ve ark. 1998; Costa ve ark. 1998; Ak 2000; Turutoglu ve ark. 2002; Gülcü ve Ertaş 2004; El-Zubeir ve ark. 2006; Turutoglu ve Ozturk 2007; Tel ve ark. 2009; Türkyılmaz ve ark. 2010; Büyükcangaz ve ark. 2012; Gülhan ve ark. 2011; Çokal ve Konuş 2012; Yeşilmen ve ark. 2012). Burdur'da yapılan bu çalışmada benzer biçimde başta *E. coli* (% 54.30) ve *K. pneumoniae* (% 17.88) olmak üzere, diğer Gram negatif bakterilerin de izolasyonu yapıldı. Gram negatif bakteri izolasyon oranı (% 8.84), diğer çalışmalarla (Türütoğlu ve ark. 1995; Costa ve ark. 1998; Gülcü ve Ertaş 2004; Dereje ve ark. 2018; Tel ve ark. 2009; Türkyılmaz ve ark. 2010; Büyükcangaz ve ark. 2012; Yeşilmen ve ark. 2012) karşılaştırıldığında oldukça düşük bulundu. Koliform ya da çevresel mastitis patojenleri olarak tanımlanan bakterilerin çevre, toprak ve dışkıda bulunabileceği, özellikle kuru dönem antibiyotik uygulamaları, sağım sırasında kullanılan kontamine sular ve sağım ekipmanlarından veya kontamine enjektörlerle meme içi uygulamalar sonrasında mastitise yol açabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Osborne ve ark. 1981; Silva ve Costa 2001; Ribeiro ve ark. 2008). Mastitis tedavisinde antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, Gram negatif bakterilerin neden olduğu mastitis vakalarında hayvanlar antibiyotiklerle tedavi edilmesine rağmen, genellikle septisemi ve toksemi nedeniyle ölürlere (McLennan ve ark. 1997; Ribeiro ve ark. 2008). Sunulan çalışmada; Gram negatif bakteriler kloksasilin, eritromisin, oksitetrasiklin ve amoksisiline, sırasıyla %96.69, %96.03, %76.16 ve %70.86 oranlarında dirençli saptanırken, diğer antibiyotiklere karşı da değişen oranlarda dirençli bulundu. Yapılan çalışmalarda *E. coli* izolatlarının amoksisilin klavulanik asite %25.7-%87.5, gentamisine %0-% 62.5, eritromisine %23.53-% 93, enrofloksasine %10.9-% 60, oksitetrasikline %33.7- %96, trimetoprim sulfametoksazol % 0-% 80 arasında dirençli olduğu bildirilmiştir (Mekonnen ve ark. 2005; El-Zubeir ve ark. 2006; Turutoglu ve Ozturk 2007; Tel ve ark. 2009; Ahmed ve Shimamoto 2011; Büyükcangaz ve ark. 2012; Aleksh ve ark. 2013; Dereje ve ark. 2018; Sağlam ve ark. 2018). Ayrıca mastitisli sütlerden izole edilen *E. coli* izolatlarının amoksisiline %40 (Büyükcangaz ve ark. 2012) ve sefoperazona %46.2 (Sağlam ve ark. 2018) dirençli bulunduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise, *E. coli* izolatlarının %98.78'inin eritromisin ve kloksasiline, %75.61'sinin oksitetrasikline, %73.17'sinin amoksisiline dirençli olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen *E. coli* izolatlarının eritromisin ve amoksisiline yüksek oranda dirençli, sefoperazona direncin ise Sağlam ve ark. (2018)'nin bulunduğu orana benzer olduğu saptanmıştır. Test edilen diğer antibiyotiklere ise çalışmalarda belirlenen aralıklarda direnç saptanmıştır. Farklı bölgelerde mastitisli

sütlerden izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere dirençliliğindeki farklılıklar, antibiyotiklerin bilinçsiz ve sık kullanımına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Burdur'da 2000-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada (Turutoglu ve Ozturk 2007), izole edilen *E. coli* izolatlarının enrofloksasin, amoksisilin klavulanik asit, gentamisine, oksitetrasiklin, ve trimetoprim sulfamethoxazole dirençlilik oranları sırasıyla %10.9, %25.7, %33.7, %51.5 ve %64.4 bildirilmiştir. Sunulan bu çalışma verileri ile karşılaştırıldığında, Burdur'da 10-15 yıl içinde enrofloksasin, amoksisilin klavulanik asit, gentamisine ve oksitetrasikline dirençlilik oranlarında oldukça yüksek artış olurken, trimetoprim sulfamethoxazole direncinde azalma saptanmıştır. Bu yüksek direnç, Burdur ilinde antibiyotiklerin veteriner hekimler ve hayvan sahipleri tarafından sık ve gelişigüzel kullanımından kaynaklanmış olabilir. Nitekim, antibiyotiklerin uygun olmayan şekillerde sıklıkla kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Dinç ve ark. 2012; Hinthong ve ark. 2017). Geçmiş yıllarda, tüm Türkiye'de olduğu gibi Burdur'da da antibiyotikler kolaylıkla temin edilip, gelişigüzel kullanılmaktaydı. Ancak son yıllarda antibiyotiklerin reçetelendirilmesi ile tedavide antibiyotik kullanımında sınırlandırma getirilmiştir. *E. coli* izolatlarında trimetoprim sulfametoksazol direncinde azalma ise, tedavide bu antibiyotiğin önceki yıllara göre fazla tercih edilmemesine bağlı olabilir.

Mastitisli sütlerden izole edilen diğer Gram negatif bakterilerin (*E.coli* ve *Pasteurella* sp. izolatları hariç) çalışmada kullanılan antibiyotiklerden en az ikisine (eritromisin ve kloksasilin), en fazla altısına (amoksisilin klavulanik asit, amoksisilin, eritromisin, kloksasilin, oksitetrasiklin ve sülphamethaksazol trimetoprim) dirençli olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; Burdur ilinde mastitisli sütlerden izole edilen Gram negatif bakteriler içinde *E. coli*'nin ilk sırayı aldığı, bunu *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Citrobacter* sp.'nin takip ettiği, bu bakterilerin kloksasilin, eritromisin, amoksisilin ve oksitetrasikline yüksek oranda dirençli olduğu, Gram negatif bakterilerin antibiyotiklere dirençliliklerindeki farklılıklar nedeniyle tedavinin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yapılması gerektiği kanısına varıldı.

## KAYNAKLAR

- Ahmed AM, Shimamoto T (2011). Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol Immunol*, 55, 318-327.
- Ak S (2000). Trakya yöresinde sığır mastitisinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Istanbul Üniv Vet Fak Derg*, 26 (2), 353-365.
- Aleksh MO, Al-Qudah KM, Al-Saleh A (2013). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from bovine mastitis in northern Jordan. *Revue Méd. Vét*, 164, 6, 319-326.
- Aydın N, Paracıoğlu J (2006). Veteriner Mikrobiyoloji. Ankara: İlke-Emek Yayınları.
- Büyükcangaz E, Mat B, Ahmed MKKA (2012). Subklinik mastitisli sığır sütlerinin mikrobiyolojik analizi ve izolatların antimikrobiyal direnç profilleri. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg* 31 (2), 35-44.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement, CLSI document, VET01-S2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Melville P (1998). Infectious bovine mastitis caused by environmental organism. *Zbl Vet Med (B)*, 45, 65-71.
- Çokal Y, Konuş R (2012). Isolation of aerobic bacteria from milk of subclinical mastitis cows. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*, 1(2), 65-69.

- Dereje K, Kebede A, Abebe N, Tamiru Y (2018).** Isolation, identification and antimicrobial susceptibility test of mastitis causing bacteria at Holeta Agricultural Research Center Dairy Farms. IJAST, 2 (1), 6-13.
- Dinç G, Ata Z ve Temelli S (2012).** Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. Ankara Univ Vet Fak Derg, 59, 85-88.
- El-Zubeir IEM, Kutzer P, El Owni OAO (2006).** Frequencies and antibiotic susceptibility patterns of bacteria causing mastitis among cows and their environment in Khartoum State. Res J Microbiol, 1(2), 101-109.
- Gülcü HB, Ertaş HB (2004).** Bacteriological investigation of udder lobes of cows with mastitis slaughtered in the Elazığ region. Turk J Vet Anim Sci, 28, 91-94.
- Gülhan T, Aksakal A, Ekin İH, Boynukara B (2011).** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında teşhis amacıyla incelenen materyallerin retrospektif bir değerlendirmesi. YYÜ Vet Fak Derg, 22(2):127-132.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İH, Gülhan T (1998).** Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir çalışma. Van YYÜ. Vet Fak Derg, 9(1-2):1-4.
- Hertl JA, Gröhn YT, Leach JDG ve ark (2010).** Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. J Dairy Sci, 93 (4), 1551-1560.
- Hinthong W, Pumipuntu N, Santajit S ve ark (2017).** Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. PeerJ 5:e3431; DOI 10.7717/peerj.3431
- Hogan J, Smith KL (2003).** Coliform mastitis. Vet Res, 34, 507-519.
- McLennan MW, Kelly WR, O'boyle D (1997).** Pseudomonas mastitis in a dairy herd. Aust Vet J, 75 (11).
- Mekonnen H, Workneh S, Bayleyegn M, Moges A, Tadele K (2005).** Antimicrobial susceptibility profiles of mastitis isolates from cows in three major Ethiopian dairies, Revue Méd Vét, 156 (7), 391-394.
- Osborne AD, Armstrong K, Catrysse NH, Butler G ve Versavel L (1981).** An Outbreak of Pseudomonas Mastitis in Dairy Cows. Can Vet J, 22, 215-217.
- Ribeiro MG, Motta RG, Paes AC ve ark (2008).** Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. Arq Bras Med Vet Zootec, 60 (2), 485-488.
- Sabuncuoğlu N ve Çoban Ö (2006).** Mastitis Ekonomisi, Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 1 (1-2) 1-5.
- Sağlam AG, Otlu S, Çoşkun MR, Çelik E, Büyük F, Şahin M (2018).** İneklerde Subklinik Mastitis Prevalansı, Etken İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Eurasian J Vet Sci, 34 (2.) 92-98.
- Silva N, Costa GM.. (2001).** An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. Arq Bras Med Vet Zootec, 53(4), 1-5.
- Schukken Y, Chuff M, Moroni P ve ark (2012).** The "Other" Gram-Negative Bacteria in Mastitis (*Klebsiella*, *Serratia*, and More). Vet Clin North Am Food Anim Pract, 28 (2), 239-56.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB (2009).** Subclinical mastitis prevalence and determination of the antibiotics susceptibility in Sanliurfa Region. FÜ Sağ Bil Vet Derg, 23 (2), 101-106.
- Türkyılmaz S, Yıldız Ö, Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B (2010).** Molecular identification of bacteria isolated from dairy herds with mastitis. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16 (6), 1025-1032.
- Turutoglu H, Mudul S, Pehlivanoglu F (2002).** Antibiotic susceptibility and  $\beta$ -lactamase prevalence for staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples, Acta Veterinaria (Beograd), 52, 5-6, 337-344.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M (1995).** Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 26, 125-137.
- Turutoglu H, Ozturk D (2007).** In vitro activity of chosen antibiotics against *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis cases. Medycyna Wet, 63 (1), 65-67.
- Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S (2012).** Diyarbakır Yöresinde Subklinik Mastitisli İneklerde Etken İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 1 (4), 24-29.
- Winn W, Allen S, Janda, W, Koneman E ve ark (2006).** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, New York.





## Confocal Images of The Colocalization and Upregulation of Vasotocin and Galanin After Water Deprivation in Roosters

Seçil ÇABUK

Federal Agricultural Research Centre (FAL), Institut for Animal Science, Department of Functional Genetic and Bioregulation, Neustadt, Germany

Received: 17.01.2019

Accepted: 14.06.2019

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of dehydration on galanin and vasotocin colocalization and galanin expression in the hypothalamo-neurohypophysial system. Adult (age: 22 to 35 weeks) roosters were used and deprived of drinking water for 48 hours in this study. The effects of dehydration were examined by measuring plasma osmolality, plasma levels of potassium, sodium and plasma vasotocin concentration. Double staining immunohistochemistry combined with confocal laser microscopy was utilized to determine the effects of dehydration on hypothalamic magnocellular neurons in the supraoptic and paraventricular nucleus and to verify the extend of colocalization. The results indicate that 48 hours water deprivation caused a moderate dehydration and significantly elevation of plasma osmolality, plasma sodium and vasotocin concentration. Furthermore, the colocalization of galanin and vasotocin was imaged in response to water deprivation only in supraoptic nucleus of hypothalamus. In this study, a close functional link between galanin and vasotocin neurons was found in all dehydrated animals. The simultaneous upregulation and the colocalization of these peptides in response to water deprivation may indicate a site specific control of vasotocin by galanin.

**Keywords:** Colocalization, Galanin, Vasotocin, Water Deprivation

### ÖZ

## Su Yoksunluğu Sonrası Horozlarda Vasotocin ve Galanin Up-Regülasyonu ve Kolokalizasyonunun Konfokal Görüntüleri

Bu çalışmanın amacı, dehidratasyonun galanin ve vasotocin kolokalizasyonu ve galanin ekspresyonu üzerine etkilerini hipotalamo-nörohipofizeal sistemde incelemektir. Bu çalışmada, yetişkin horozlar (yaş: 22-35 hafta) kullanıldı ve 48 saat içme suyundan mahrum edildiler. Dehidratasyonun etkileri plazma osmolalitesi, plazma potasyum ve potasyum seviyeleri, vasotosin konsantrasyonları ölçülerek incelendi. Supraoptic ve paraventricular nükleuslardaki hipotalamik nöronlarda dehidratasyon etkilerini belirlemek ve kolokalizasyon yayılımını doğrulamak için konfokal lazer mikroskobu ile birlikte çift boyama immunhistokimyası kullanıldı. Sonuçlar, 48 saatlik su yoksunluğunun orta derecede dehidratasyona ve plazma ozmolalitesi, plazma sodyum ve vasotosin konsantrasyonunun önemli ölçüde yükselmesine neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca galanin ve vasotosin kolokalizasyonu susuz kalmaya cevaben hipotalamusun sadece supraoptic nükleusunda görüntülendi. Bu çalışmada, tüm dehidre hayvanlarda galanin ve vasotosin nöronları arasında yakın bir fonksiyonel ilişki bulundu. Su yoksunluğuna cevap olarak bu peptitlerin ko-lokalizasyonu ve eş zamanlı olarak up-regülasyonu, galanin tarafından bölgeye özgü bir vasotosin kontrolünü gösterebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolokalizasyon, Galanin, Vasotocin, Su Yoksunluğu

### INTRODUCTION

Vasotocin is an oligopeptide homologous to vasopressin and oxytocin found in all non-mammalian vertebrates. Vasotocin is synthesized in supraoptic nucleus and paraventricular nucleus of hypothalamus and then transported in neurosecretory granules along the axons to posterior pituitary (Burbach et al. 2001). Vasotocin is known to be involved in the regulation of water balance

and also regulation of uterine contractions for oviposition in avian species. Galanin is a 29 amino acid peptide and found to be a potent modulator of neuroendocrine regulation. Galanin is distributed throughout the central nervous system and particularly concentrated within the basal forebrain, hypothalamus, septal region and amygdala in the rat and monkey (Merchenthaler et al. 1993). Dehydration is inducible in terrestrial animals by water

deprivation and also has been shown to be an effective stimulus for vasotocin in avian species. One of the main action of vasotocin is the stimulation of renal water reabsorption at the distal convoluted tubules and the collecting ducts in the kidney (Stallone and Braun 1986a). There are several reports demonstrating that either water deprivation (Mühlbauer et al. 1992; Chaturvedi et al. 2001) or administration of hypertonic saline (Koike et al. 1986; Stallone and Braun 1986a) cause to elevate the plasma osmolality and the plasma vasotocin levels in chickens.

The aim of this study was to investigate effects of dehydration on galanin and vasotocin colocalization. Besides the control of water balance, vasotocin is strongly involved in the mechanisms leading to egg laying in female birds. Thus, to avoid any influence with egg laying, only roosters were used. To this end the expression pattern and signal intensities of vasotocin and galanin in supraoptic and in paraventricular nucleus of hypothalamus were evaluated.

## MATERIALS and METHODS

### Experimental design and tissue preparation

A total of adult 16 roosters (Lohman- Selected Leghorn) were used at the age of 22-35 weeks. Animal maintenance and the experiments were conducted in accordance with the relevant laws and regulations that govern the treatment of experimental animals (AZ: 5096-4250213). All studies were performed at the Institut für Tierzucht Mariensee der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft. One group of rooster (n=8) was deprived from water for 48 hours. At the end of dehydration period, blood sample (1 ml) from each animal (8 normohydrated and 8 dehydrated) was withdrawn from wing vein into the heparinized tube. Plasma was separated by centrifugation (3000 rpm, 15min, 4 °C) for measurement of AVT, plasma osmolality, plasma sodium and potassium concentration. Plasma osmolality was determined by vapor pressure osmometry (Wescor 5500, Wescor Inc, Logan, USA). Plasma levels of sodium and potassium were measured by using gas analysing system (Rapid Lab 865, Bayer Healthcare, Fernwald, Germany). Immediately after the withdrawal of the blood samples, roosters were euthanased and perfused. Perfusion was performed via carotid arteries with 150 ml 0.1M phosphate buffer saline (PBS pH 7.4) containing 0.2% heparin followed by 360ml Zamboni's fixative (4% paraformaldehyde and 150 ml saturated picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4). The brains were removed and postfixed for 6-8 hours in the same fixative. They placed into 25% sucrose solution in 0.1 phosphate buffer saline (PBS) for cryoprotection. The brains were then stored at -80 °C until cut into transverse serial sections of 40 µm using a cryostat (Reicher-Jung, 2800, Frigocut-E). Fifty sections from each brain, corresponding to the levels of brain chicken atlas (Kuenzel and Masson 1988) were collected in 0.02 M PBS and processed for immunohistochemistry.

### Procedure of the immunohistochemistry and laser scanning confocal microscopy

In this study the indirect method of immunohistochemistry with use of a fluorescent label was utilized for laser scanning confocal microscopy. Immunohistochemical procedures were performed essentially as described by Jurkevich et al. 1999. The sections were washed six times in 0.02 M PBS at room temperature. After that the sections were incubated for 30

min in 0.02 M PBS containing 10% normal goat serum (Dako, Hamburg) and 0.2% Triton X-100. The sections were then incubated with rabbit polyclonal antibody against vasotocin diluted 1:30.000 and guinea pig antibody against galanin (Peninsula laboratories, California) diluted 1:600 in 0.02 M PBS with 1% normal goat serum, 0.2% Triton X-100 and 0.1% sodium azide for 22 hours at 4 °C. After that, the sections were rinsed in 0.02 M PBS and incubated with goat anti-rabbit IgG coupled with ALEXA 555 (Vector lab, Burlingame, TI-1000) diluted 1: 400 and goat anti-guinea pig IgG coupled with fluorescein (FITC, Vector, FI-7000) diluted 1:400 in 0.02 M PBS with 0.2 % Triton X-100, 1% normal goat serum and 0.1% sodium azide in the dark at room temperature for 90 min. After washing, the sections were rinsed again in 0.02 M PBS with 0.2% Triton X-100 and mounted on gelatin coated slides with vectashield mounting medium (Vector, H-1000) and then sealed with coverslips using colorless nail polish. The slides were stored at 4 °C and protected from the light. Thus, the tissues were prepared for examination under laser scanning confocal microscopy.

### Processing and analysis of data

The student's t-test was employed to determine the differences in plasma vasotocin, osmolality, sodium, and potassium between the control and dehydration group. Pearson correlation test was used to verify correlation between plasma vasotocin and osmolality levels in dehydrated and normohydrated animals. Statistical analysis was performed using a software package (Sigma Stat, Version 2.0). No attempt was undertaken to statistically analyse the neuroanatomical data.

## RESULTS

### Effects of dehydration on blood parameters

As a result of 48 hours water deprivation, the levels of plasma vasotocin ( $p \leq 0.001$ ), plasma sodium ( $p \leq 0.001$ ) and plasma osmolality ( $p \leq 0.001$ ) were significantly increased in dehydrated animals. On the other hand, there were no significant differences in plasma potassium levels between normohydrated and dehydrated groups. Neither in normohydrated ( $r=0.41$ ;  $p>0.05$ ) nor in dehydrated ( $r=0.009$ ;  $p>0.05$ ) animals was a significant correlation detected between plasma vasotocin and plasma osmolality levels (Table 1).

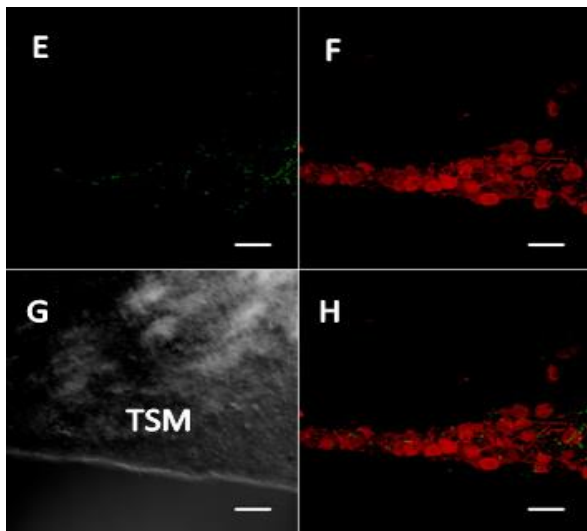
**Table 1.** Effects of 48 hours water deprivation on plasma osmolality and plasma concentration of vasotocin (AVT), sodium (Na) and potassium (K) in adult roosters

Treatment	Osmolality (Mmol/l) mean±SEM	Sodium (Na) (Mmol/l) mean±SEM	Potassium (K) (Mmol/l) mean±SEM	(AVT) (Mmol/l) mean±SEM
Dehydrated	312.25±2.65* (n=8)	166.56±1.84* (n=8)	3.65±0.20 (n=8)	44.19±5.23* (n=6)
Control	295.00±3.12 (n=8)	155.05±1.29 (n=8)	3.57±0.15 (n=8)	15.39±2.91 (n=6)

\*Values indicate mean ±S.E.M; n=8 (for AVT n=6) ;  
\* $p < 0.001$  (Student 's t-test)

### Vasotocin and galanin colocalization in supraoptic nucleus

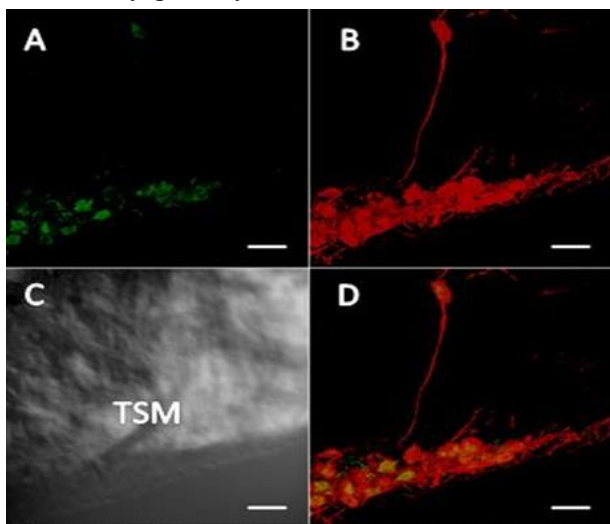
The intensity of immunolabeling in supraoptic nucleus was weaker for galanin than for vasotocin (Figure 1) in all brain sections of the 8 normohydrated animals.



**Figure 1.** Demonstration of galanin (green) and vasotocin (red) immunoreactivity in supraoptic nucleus in normohydrated adult roosters. Galanin-containing neurons were not found but a few of neuronal fibers of galanin (E) were stained in this region. Vasotocin-containing neurons showed strong labeling in both cell bodies (F) and nerve fibers. Tractus septomesencephalicus (TSM) shown in differential interference contrast (G) for better orientation. The colocalization of galanin and vasotocin was not found (H) in normohydrated animals. Scale bar indicates 50  $\mu$ m

The cell bodies of galanin neurons were not found but interestingly, a few neuronal fibers of galanin neurons were detected in supraoptic nucleus in all normohydrated animals (Figure 1E). Vasotocin-containing neurons showed strong labeling in both cell bodies and nerve fibers in supraoptic nucleus in all normohydrated animals (Figure 1F). In normohydrated animals, the colocalization of galanin and vasotocin was not detected in supraoptic nucleus (Figure 1H).

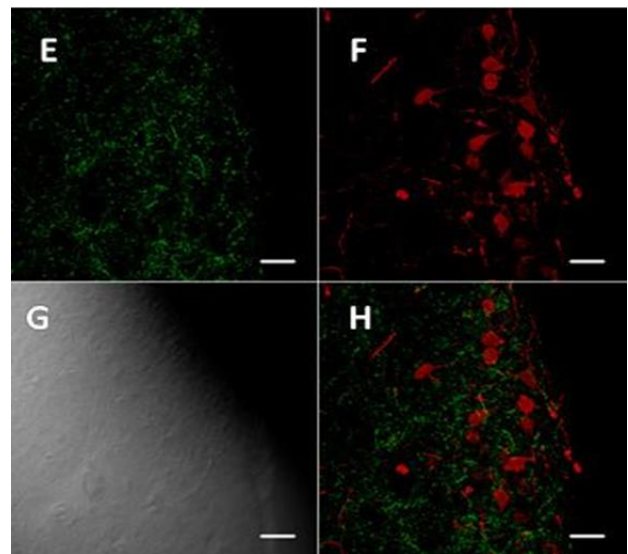
The pattern of distribution and the intensity of the labelling were different in dehydrated animals. In all 8 dehydrated animals, in contrast to the normohydrated animals, galanin immunoreactive neurons were observed in sections (Figure 2A). A clear upregulation of vasotocin was found in supraoptic nucleus in all dehydrated animals (Figure 2B). The colocalization of galanin and vasotocin was also detected in dehydrated animals (Figure 2D). The signals of colocalization appeared in yellow fluorescence in all sections (Figure 2D).



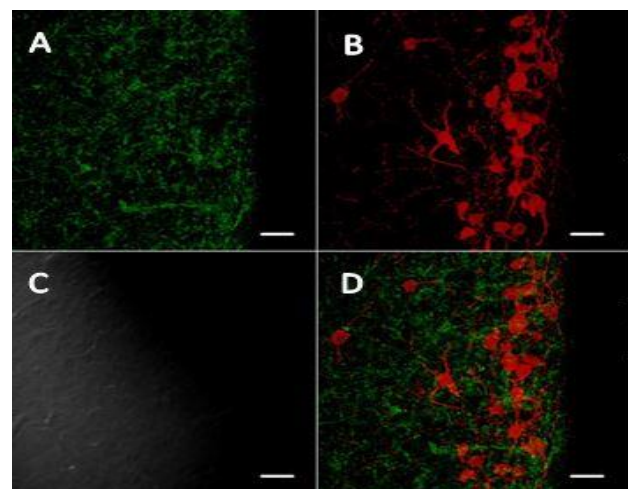
**Figure 2.** Demonstration of galanin (green) and vasotocin (red) immunoreactivity in supraoptic nucleus in dehydrated adult roosters. Galanin (A) and vasotocin (B) immunoreactive neurons were detected in this region. Tractus septomesencephalicus (TSM) shown in differential interference contrast (C) for better orientation. The colocalizations of galanin and vasotocin were found in yellow fluorescence (D) in dehydrated animals. Scale bar indicates 50  $\mu$ m

#### Lack of vasotocin and galanin colocalization in paraventricular nucleus

Magnocellular neurons of paraventricular nucleus were also heavily stained for vasotocin (Figure 3F and Figure 4B) and dendritic fibers of galanin were intensely detected in both normohydrated (Figure 3E) and dehydrated (Figure 4A) animals. The colocalization of galanin and vasotocin was not detected in normohydrated (Figure 3H) and dehydrated animals (Figure 4D).



**Figure 3.** Demonstration of galanin (green) and vasotocin (red) immunoreactivity in paraventricular nucleus in normohydrated adult roosters. Neuronal fibers of galanin cells (E) were detected and vasotocin (F) immunoreactive neurons were intensely stained in this region. Differential interference contrast (G) shown for better orientation. The colocalization of galanin and vasotocin was not found (H) in paraventricular nucleus. Scale bar indicates 50  $\mu$ m



**Figure 4.** Demonstration of galanin (green) and vasotocin (red) immunoreactivity in paraventricular nucleus in dehydrated adult roosters. Neuronal fibers of galanin cells (A) were detected and vasotocin (B) immunoreactive



neurons were intensively stained in this region. Differential interference contrast (C) shown for better orientation. The colocalization of galanin and vasotocin was not found (D) in paraventricular nucleus. Scale bar indicates 50  $\mu$ m

## DISCUSSION and CONCLUSION

The osmoregulatory system within the hypothalamo-neurohypophysial axis was stimulated in this study and the results showed that water deprivation for 48 hours as an osmotic stimulus caused an increase in the plasma vasotocin levels concomitant with enhancement of plasma osmolality. This is in agreement with data published by Nouwen et al. (1984) and Arad et al. (1985). On the other hand, a correlation was not found between vasotocin and osmolality levels in this study; neither in normohydrated nor in dehydrated animals. This is also in agreement with data published by Nouwen et al. (1984). But, some other researches found a correlation between plasma vasotocin and plasma osmolality during water deprivation (Arad et al. 1985; Stallone and Braun 1986). The discrepancies could be due to the differences in the breeds, sex, age and housing of the animals used in different experiments. The results of immunohistochemistry combined with confocal laser microscopy study confirm the intensifying of vasotocin in supraoptic as well as paraventricular nucleus in response to the 48 hours of water deprivation. This increment indicates that osmotic challenge has resulted in activation of vasotocin expressing in these nuclei and the dehydration has been moderate in all dehydrated animals. Magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system as well as the parvocellular hypothalamo-anterior pituitary system contain large number of galanin-containing neurons (Palkovits et al. 1987). In the rat, cell bodies of galanin neurons were detected in supraoptic and paraventricular nucleus and terminal of their axons were found in the posterior lobe of the pituitary (Palkovits et al. 1987; Arad et al. 1990; Gundlach and Burazin 1998). GAL has been assumed to have an inhibitory action on the biosynthesis and axonal transport of oxytocin but these effects of galanin has not been assumed on vasopressin in normohydrated rats (Ciosek 2000). But, interestingly, above authors indicated that in salt-loaded rats GAL attenuates the secretion of oxytocin and vasopressin. This is in good agreement with present data showing an upregulation of galanin and vasotocin only in dehydrated animals. A work of laboratory (Klein et al. 2006) confirm the presence of galanin-containing and vasotocin-containing neurons in paraventricular nucleus of chickens and roosters. They also could not observe any colocalization of galanin and vasotocin in these nuclei. However, in the supraoptic nucleus they could determine significantly higher degree of colocalization. This is in good agreement with the present finding, which indicate a colocalization of galanin and vasotocin only in the supraoptic nucleus. The present data shows for the first time the enhanced expression of galanin and vasotocin in the hypothalamo-neurohypophysial system due to osmotic stress. This could explain that vasotocin is controlled by paracrine/autocrine secretion and activity of galanin in supraoptic nucleus. Interestingly, a subpopulation of magnocellular neurosecretory neurons in supraoptic nucleus expressed vasotocin only after water deprivation. It is possible that these cells are the sites of colocalization. It is also interesting to note that a dense dendritic fibers of galanin and vasotocin neurons investigated in supraoptic and paraventricular nucleus. This result confirms previous research that a dendritic release of vasopressin has been

shown in the hypothalamic magnocellular nuclei (Morris et al. 1998; Pow and Morris 1989; Wang et al. 1995; Ludwig 1998).

In conclusion, the results of the present study show a close functional link between galanin and vasotocin neurons. The colocalization and simultaneous upregulation of these peptides in response to water deprivation may indicate a site specific control of vasotocin by galanin.

## ACKNOWLEDGEMENT

I am grateful to G. Neuhaus and S. Klein for their skilled technical assistance.

## REFERENCES

- Arad Z, Arnason SS, Chadwick A, Skadhauge E (1985). Osmotic and hormonal response to heat and dehydration in the fowl, *J Comp Physiol*, 155, 227-234.
- Arad Z, Altmann M, Trachsel H (1990). The nonmammalian transition through neurohypophyseal peptides. *Peptides*, 6,309-314.
- Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev*, 81, 1197-1267.
- Chaturvedi CM, Chawdhury A, Cornett LE (2001). Water deprivation and circadian changes plasma arginine vasotocin and mesotocin in the domestic hen, *Chonoiology International*, 18, 947-956.
- Ciosek J (2000). Vasopressin and oxytocin release from the neurohypophysis, *Endocrinol Pol*, 51, 113-123.
- Gundlach AL, Burazin TC (1998). Galanin receptor system in the hypothalamic, paraventricular and supraoptic nuclei, *Ann NY Acad Sci*, 863, 241-251.
- Jurkevich A, Barth SW, Kuenzel WJ, Köhler A, Grossmann R (1999). Development of sexuality dimorphic vasotocinergic system in the bed nucleus of stria terminalis, *J Comp Neurol*, 408, 46-60.
- Klein S, Jurkevich A, Grossmann R (2006). Sexually dimorphic immunoreactivity cells and fibers in the canary brain, *J Comp Neurol*, 263, 347-364.
- Koike TI, Shimada K, Cornett LE (1986). Plasma levels of immunoreactive mesotocin and vasotocin during oviposition in chickens: relationship to oxytocin action of the peptides in vitro and peptides interaction with myometrial membrane binding sites, *Gen Comp Endocrinol*, 70, 119-126.
- Kuenzel WJ, Masson M (1988). A stereotactic atlas of brain of the chick.1-166, In: John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Ludwig M (1988). Dendritic release of vasopressin and oxytocin, *J Neuroendocrinol*, 10, 881-895.
- Merchantaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1993). Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways, *Progress in Neurobiology*, 40, 711-769.
- Morris JF, Budd TC, Epton MJ, Ma D, Pow DV, Wang H (1998). Functions of perikaryon and dendrites in magnocellular vasopressin secreteur neurons, *Prog Brain Res*, 119, 21-30.
- Mühlbauer E, Hamann D, Xu B, Ivell R, Ellendorff F, Grossmann R (1992). Arginine-vasotocin gene expression during osmotic challenge in the chicken, *J Neuroendocrin*, 4, 347-351.
- Nouwen EJ, Decuyper E, Kühn ER, Michels H, Hall TR (1984). Effects of dehydration, hemorrhage and oviposition on serum concentration of vasotocin, mesotocin and prolactin in th chicken, *J Endocrinol*, 102, 345-355.
- Palkovits M, Rókaeus L, Antoni FA, Kiss A (1987). Galanin in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroendocrinology*, 46, 417-423.
- Pow DV, Morris JF (1989). Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis, *Neuroscience*, 32, 435-439.
- Roberts MM, Robinson AG, Hoffmann GE, Fitzsimmons MD (1991). Vasopressin transport to the synthesis regulation is coupled rate, *Neuroendocrinology*, 53, 416-422.
- Stallone JN, Braun EJ (1986a). Regulation of plasma arginine vasotocin in conscious water-deprived osmotic fowl, *J Physiol*, 250, 644-664.
- Wang H, Ward AR, Morris JF (1995). Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and magnocellular neuron, *Neuroscience*, 68, 1179-1188.





## Bacterial Infections and Antibiogram Results of Farm, Pet and Other Some Animals in the Aegean Region

Meriç Lütfi AVSEVER

Aksaray University, Eskil Vocational High School, Department of Veterinary, Aksaray, Turkey

Received: 31.01.2019

Accepted: 25.07.2019

### ABSTRACT

In this work, bacterial agents and antibiotic susceptibility patterns isolated from samples belonging to cattle, sheep, goats, avian species, fish, cat, dog and alternative species (deer, ibex etc. ) sent to the laboratory from different provinces of Aegean region for diagnostic purposes between 2013 and 2014 are reported. The aim of this study was to share antibiogram data on bacterial diseases in the various animal, to contribute to more effective treatment and to draw attention to increasing resistance to antibiotics in animal diseases. Conventional microbiological methods, fully automatic identification devices and molecular methods were used in the study. Various Gram positive and negative bacteria were isolated and florfenicol was determined to be the most effective antibiotic for bacterial infections in many animal species. Bacterial isolates were found to be least susceptible to oxytetracycline and sulfamethoxazole+trimethoprim. Although the findings of the study are compatible with the studies on the resistance of bacterium to antibiotics, it is different from many studies because it provides aggregate data.

**Keywords:** Farm animals, Cats, Dogs, Bacterial infections, Disc diffusion method

### ÖZ

## Ege Bölgesindeki Çiftlik, Pet ve Diğer Bazı Hayvanlarının Bakteriyel Enfeksiyonları ve Antibiogram Sonuçları

Bu çalışmada 2013 ve 2014 yıllarında, Ege bölgesinden hastalık teşhisi amacıyla laboratuvara gönderilmiş olan sığır, koyun, keçi, kanatlı, balık, kedi, köpek ve alternatif türlere (geyik, dağ keçisi vs) ait numunelerden izole edilen bakteriler ve bunlara ait antibiyogram sonuçları verilmiştir. Bu çalışmanın amacı çalışmaya dahil edilen hayvanlardaki bakteriyel hastalıklarla ilgili antibiyogram verilerini paylaşmak, daha etkili tedavi yapılmasına katkı sağlamak ve hayvan hastalıklarında artan dirençli patojen bakterilere dikkat çekmektir. Çalışmada konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler, tam otomatik identifikasyon cihazları ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre Ege bölgesindeki pet ve çiftlik hayvanlarından çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteri türleri izole edilirken; florfenikol, pek çok hayvan türüne ait bakteriyel enfeksiyonda en etkili antibiyotik tespit edilmiştir. Bakterilerin en az duyarlı olduğu antibiyotikler ise oksitetrasiklin ve sulfametaksazol + trimetoprimin bulunmuştur. Bu çalışma ile Ege bölgesindeki çiftlik ve bazı pet hayvanlarında hastalık oluşturabilecek bakteriler ve bunlara karşı kullanılacak antibiyotikler hakkında güncel ve toplu bir veri ortaya konmuştur. Çalışma bulguları bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesi ile ilgili çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte, toplu bir veri sağladığı için birçok çalışmadan farklıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Çiftlik hayvanları, Kedi- köpek, Bakteriyel enfeksiyonlar, Disk difüzyon tekniği

### INTRODUCTION

Penicillin is the first antibiotic to be discovered in 1928. 12 years later, Abraham and Chain, reported the existence of the penicillinase enzyme in *Escherichia coli* and this was the first case of resistance against antimicrobials (Tenover 1996) Although many new antimicrobial compounds were discovered, almost every year many of these are seen to lose their effect due to development of resistance. According to National Fund for Infectious Diseases (NFID)

annual cost of antibiotic resistance is about 4 million dollars and there are about 63.000 lives lost every year because of resistant bacteria (Anonymous 1). For this reason, antibiotic use should be limited to necessary situations and proper dosage and period. Antibiotic use is very common in Turkey in both medicine and veterinary medicine. Veterinary antibiotic preparations are predominantly used in the respiratory system diseases of small and large animals, in colisepticemia (Boynukara et al. 2002; Ülker et al. 2002; Gökçe et al. 2010; Gümüşsoy

2013) in mastitis cases (Akan et al. 2001); in bacterial diseases of avian species (Zhao et al. 2001), in bacterial diseases of marine and freshwater fish species (Austin and Austin 2012; Baydan et al. 2012; Dinç et al. 2013) in bacterial diseases of cats and dogs (Degi et al. 2012) and in diseases of alternative species (deer, ibex etc.). Animal husbandry and farming are popular economic activities in the Aegean Region of Turkey. In this region, dairy farming and poultry production are especially well-developed. 90% of all mariculture establishments in Turkey are located in this region as well. As a result, use of antibiotics to combat bacterial diseases is commonplace in this region. The antibacterials approved for veterinary use are listed in the web site belonging to the Ministry of Food, Agriculture and Livestock (Anonymous 2). Application of antibiotics in cattle, small ruminants, dogs and cats are with injections, in poultry they are generally administered through feed and water, and in fish through feed.

The aim of this work is to present the findings related to bacterial isolates and antibiotic susceptibility patterns obtained from farm and companion animals in the Aegean Region, to contribute the effort towards more efficient therapy options and to draw attention to antibiotic resistance problems in animals.

## MATERIALS and METHODS

### Samples

In this work, 1175 bacterial isolates from samples of cattle, sheep, goats, avian species, fish, cat, dog and other species (deer, ibex etc. ) submitted to the laboratory between 2013-2014 for disease diagnosis were used. Information about the origins and numbers of isolates are supplied in Table 1.

### Isolation and Identification

Internal organ samples (spleen, liver, kidneys, lungs) from animals sent for disease diagnosis were inoculated on general growth media; incubation conditions were 1-5 days in 22 °C for fish samples and in 37 °C for others. Bacterial colonies were generally identified with biochemical methods on a genus level (Arda et al. 1997; Austin and Austin, 2012). *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus galactiae* ssp. *agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Aeromonas hydrophila* / *caviae*, *Aeromonas sobria*, *Lactococcus garvieae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella* group, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus paragallinarum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Escherichia fergusonii*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lentus*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Streptococcus parasanguinis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus vitulinus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus salivarius*, *Enterobacter cloacae* complex, *Proteus mirabilis* were identified with Vitek 2-Compact Identification System. *Listonella anguillarum*, *Yersinia ruckerii*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum* and *Vagococcus salmoninarum* were identified on a species level with Polymerase Chain Reaction (PCR) (Versalovi et al. 1991; Toyoma et al. 1996; Zlotkin et al. 1998; Rajan et al. 2003; Hong et al. 2007).

### Antimicrobial Susceptibility Testing by The Kirby-Bauer Disc Diffusion Method

4-5 colonies from solid media were inoculated in sterile Physiological Saline and a suspension was made according to 0.5 Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  cfu/ml). 100 µl suspension was spread on Mueller-Hinton Agar with the exception of *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. which were inoculated on Blood Agar (Koneman et al. 1997). Antibiotic discs were placed aseptically on the surface using a automatic disc dispenser. Isolates from fish samples were incubated under 22 °C, others under 37 °C for 24-48 hours. Inhibition zones were later measured and compared to reference values (NCCLS 2000; Alderman and Smith 2001). When antibiotic susceptibility test results were transferred into table, chickens, fish, cats, dogs and alternative species were grouped according to species while large and small ruminants were grouped according to respiratory diseases, mastitis and colisepticemia cases.

As antibiotic discs; Florfenicol (30 µg), penicillin G (10 µg), streptomycin (10 µg), gentamycin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), trimethoprim+sulfamethoxazole (25 µg), amoxicillin (25 µg), amoxicillin+clavulonic acid (30 µg), tilmicosin (15 µg), cefaperazone (75 µg), doxycycline (30 µg), enrofloxacin (5 µg), lincomycin+spectinomycin (10 µg), neomycin (30 µg), erythromycin (15 µg), oxolinic acid (2 µg), flumequin (30 µg), colistin (10 µg), ceftiofur (30 µg), cloxacillin (5 µg), marbofloxacin (10 µg) (OXOID) were used.

## RESULTS

Pictures of identification of isolates are supplied in Figure 1 (Certain VITEK results), and Figure 2 (Certain gel electrophoresis results) while the animal species from which the isolates were obtained are supplied in Table 1 and antibiotic susceptibility patterns are supplied in Tables 2-8.

Organism	99% Probability	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bionumber: 030000156620211	Confidence: Very good identification
Organism	99% Probability	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bionumber: 010402062763231	Confidence: Excellent identification
Organism	99% Probability	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	Bionumber: 051454364315071	Confidence: Excellent identification
Organism	98% Probability	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Bionumber: 010400123023231	Confidence: Excellent identification
Selected Organism	99% Probability	<i>Escherichia coli</i>	Bionumber: 0405610550526610	Confidence: Excellent identification
Organism	93% Probability	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Bionumber: 2401600110040201	Confidence: Very good identification
Selected Organism	97% Probability	<i>Streptococcus uberis</i>	Bionumber: 171056365753471	Confidence: Excellent identification
Selected Organism	99% Probability	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Bionumber: 1001611450040200	Confidence: Excellent identification
Selected Organism	97% Probability	<i>Vibrio vulnificus</i>	Bionumber: 102010100051021	Confidence: Excellent identification

**Figure 1.** A combined picture of analysis results of certain isolates identified with the VITEK 2 Compact Identification System

**Table 1.** Animal species and cases sent to the laboratory between 2013-2014 from which the isolates were obtained

	Isolated bacteria species (spp)	Total number of cases
<b>Pneumoniae cases in small and large ruminants</b>	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Corynebacterium</i> spp.	420
<b>Mastitis cases in small and large ruminants</b>	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermitis</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Streptococcus disagalactiae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	253
<b>Colisepticemia cases in small and large ruminants</b>	<i>E. coli</i>	24
<b>Bacterial Infections of Fish</b>	<i>Listonella anguillarum</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobriae</i> , <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Photobacterium damsale</i> subsp. <i>piscicida</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Tenacibaculum maritimum</i> , <i>Vagococcus salmoninarum</i> ., <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .	212
<b>Bacterial Infections of poultry</b>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Haemophilus paragallinarum</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus salivarius</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Enterococcus cecorum</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> complex, <i>Staphylococcus aureus</i> .	243
<b>Bacterial Infections of cats and dogs</b>	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Photobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp	23
<b>Bacterial infections of other species (red deer, ibex etc.)</b>	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Photobacterium</i> spp.	6

**Table 2.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from pneumoniae cases of small and large ruminants

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Florfenicol (30 µg)	396/420	Tilmicosin (15 µg)	305/420	Ceftiofur (30 µg)	302/420
Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	281/420	Enrofloxacin (5 µg)	264/420	Gentamycin (10 µg)	256/420
Erythromycine (15 µg)	162/420	Oxytetracycline (30 µg)	96/420	Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	89/420

**Table 3.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from mastitis cases of small and large ruminants

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Florfenicol (30 µg)	235/253	Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	230/253	Ceftiofur (30 µg)	212/253
Enrofloxacin (5 µg)	194/253	Lincomycin + Spectinomycin (10 µg)	171/253	Gentamycin (10 µg)	134/253
Cloxacillin (5 µg)	130/253	Neomycine (30 µg)	/253	Oxytetracycline (30 µg)	75/253

**Table 4.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from colisepticaemia cases of small and large ruminants

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Florfenicol (30 µg)	19/24	Gentamycin (10 µg),	17/24	Lincomycin + Spectinomycin (10 µg)	15/24
Enrofloxacin (5 µg)	14/24	Colistin sulfate (10 µg),	12/24	Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	9/24
Erythromycine (15 µg)	8/24	Oxytetracycline (30 µg)	5/24	Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	4/24

**Table 5.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from poultry infections

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Gentamycin (10 µg)	168/ 243	Florfenicol (30 µg)	132/243	Ceftiofur (30 µg)	92/243
Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	72/243	Colistin sulfate (10 µg)	70/243	Enrofloxacin (5 µg)	44/243
Sulfamethoxazole-Trimethoprim	44/243	Lincomycin + Spectinomycin (10 µg)	24/243		

**Table 6.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from infections in fish

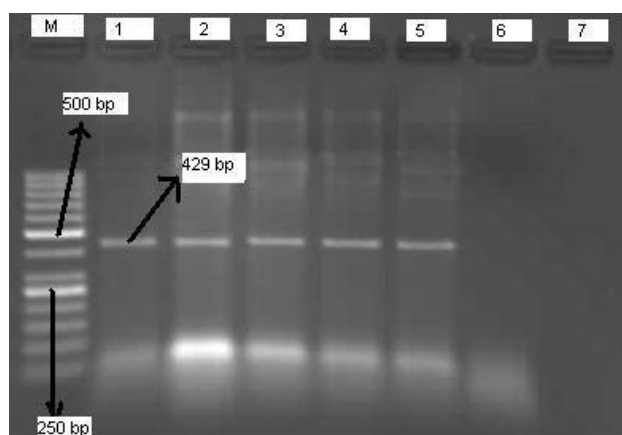
Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Florfenicol (30 µg)	199/212	Flumequin (30 µg)	125/212	Enrofloxacin (5 µg)	120/212
Oxolinic acid (2 µg)	96/212	Erythromycine (15 µg)	52/212	Doxycycline (30 µg)	24/212
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	15/212	Oxytetracycline (30 µg)	11/212	Amoxicillin (25 µg)	7/212

**Table 7.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from cats and dogs

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Ceftiofur (30 µg)	21/23	Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	20/23	Marbofloxacin (10 µg)	19/23
Lincomycin+ Spectinomycin (10 µg)	17/23	Enrofloxacin (5 µg)	16/23	Penicillin G (10 µg)	9/23
Erythromycine (15 µg)	8/23	Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	6/23	Oxytetracycline (30 µg)	5/23

**Table 8.** Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from alternative species

Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility	Antibiotic	Susceptibility
Florfenicol (30 µg)	5/6	Ceftiofur (30 µg)	5/6	Amoxicillin + Clavulonic acid (30 µg)	4/6
Lincomycin + Spectinomycin (10 µg)	4/6	Enrofloxacin (5 µg)	4/6	Penicillin G (10 µg)	4/6
Erythromycine (15 µg)	4/6	Oxytetracycline (30 µg)	3/6	Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	3/6



**Figure 2:** An example of gel electrophoresis carried out during the identification of isolates with PCR; Identification of *Listonella anguillarum* with primers specific to the *amiB* gene region. M: 50 bp Marker, 1: Positive control, *Listonella anguillarum* ATCC 19264, 429 bp; 2-5:isolates, 6: Negative control *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, 7: distilled water

## DISCUSSION and CONCLUSION

Florfenicol is revealed to be one of the most efficient antibiotics by many reports on antibiotic susceptibility tests with various bacteria isolated from animals (Shin et al. 2005; Öztürk and Çorlu 2006; Erbaş and Kaya 2008; Önat et al. 2010; Akaylı et al. 2013; Güler et al. 2013; Özcan and Sarıyüpoğlu 2013). However, due to rapidly increasing florfenicol use, there are reports regarding resistance towards this antibiotic. Keyes et al. (2013), have found a resistance gene against florfenicol in an *E.coli* isolate from an avian species. The same gene region was also found in *Photobacterium damsale* subsp. *piscicida* which is a fish pathogen. (Kim and Aoki 1996).

Bacterial respiratory diseases in large and small ruminants cause serious problems in Turkey as well as the rest of the world; creating a need for the use of several antibiotics. Florfenicol has bacteriostatic effect and is recommended especially for respiratory diseases of cattle caused by *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *Haemophilus somnus* (Shin et al. 2005). However tilmycosin is known to have stronger activity against *M. haemolytica* and *P. multocida*. Also, enrofloxacin, danofloxacin (Kaya 2007), amoxicillin + clavulonic acid, penicillin (Gifford 1998) and gentamycin (Kaya 2007) are among other recommended antibiotics for the treatment of respiratory diseases in cattle. Oxytetracycline and lincosamides may also be used in respiratory diseases of cattle. Still, there have been reports about Oxytetracycline-resistant strains so; if there is no improvement after a 24 hour initial treatment period with oxytetracycline, continuation of therapy with tilmycosin is recommended (Kaya 2007). Despite the potentially serious side effects of Lincosamides, combination of Lincomycin+Spectinomycin can be used in the respiratory diseases of cattle. Respiratory disease agents in small ruminants are reported to be similar to cattle (Tel and Keskin 2010), and same antibiotics can be used in them with a few exceptions.

In this work, bacterial isolates from lung samples of cattle, sheep and goats were found to be susceptible to florfenicol, tilmycosin, ceftiofur, amoxicillin + clavulonic acid, enrofloxacin and gentamycin. These results are generally compatible to other reports from Turkey except oxytetracycline and sulfametoksazol + trimethoprim.

These differences may be a result of different locations as well as a resistance development to these antibiotics.

Öztürk and Çorlu (2006) obtained 15 (% 25) *Mannheimia haemolytica*, 18 (%30) *Mycoplasma* spp., 2 (%3.3) *P. multocida*, 9 (%15) *Streptococcus* spp., 10 (%16.7)' *Staphylococcus* spp., 3 (%5) *Aeromonas hydrophilla* and 1 (%1.7) *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas* spp. isolates each from the lungs of lambs with pneumoniae. They also investigated the antibiotic susceptibility patterns of isolates other than *Mycoplasma* spp. with the disc diffusion method and found that *Pasteurella* spp. were susceptible to amoxicillin+clavulonic acid, enrofloxacin and florfenicol at a rate of 100%, to ampicillin, danofloxacin and furazolidone at a rate of 94.11% and to oxytetracycline at a rate of 88.23%. *Staphylococcus* spp. were found to be susceptible to enrofloxacin and florfenicol at a rate of % 100, oxytetracycline, amoxicillin+clavulonic acid and danofloxacin at a rate of 90%, gentamycin and penicillin at a rate of 80 % respectively.

Erbaş and Kaya (2008), have reported that 28 *P. multocida* isolates from lungs of cattle with pneumoniae were susceptible to florfenicol at a rate of 93.0%, to enrofloxacin at a rate of 61.0%, to oxytetracycline at a rate of 54.0% . On the other hand, 82.0% of all strains were resistant to erythromycin and sulfamethoxazole and trimethoprim; 64.0% of them were resistant to gentamycin and 61.0% were resistant to amoxicillin-clavulonic acid. Tel and Keskin (2010) reported that out of 106 strains (76 *P. multocida*, 30 *M. haemolytica*) from lung samples of sheep with pneumoniae in the Şanlıurfa province, 74 (97%) were susceptible to norfloxacin and tetracyclin, 72 (95%) to ampicillin and amoxicillin, 70 (92 %) to sulfamethoxazole and trimethoprim and 66 (87%) to erythromycin, streptomycin and gentamycin, respectively. In another work with *P. multocida* isolates (Ülker et al. 2012) carried out in the Hatay province; they were found to be susceptible to amoxicillin, amoxicillin+clavulonic acid, sulfamethoxazole+trimethoprim, enrofloxacin and penicillin G at a rate of 100%. On the other hand, Tilmycosin was also found to be effective in experimental studies with *P. multocida* ve *M. haemolytica* (Gökçe et al. 1997).

Mastitis is an important animal health problem in Turkey as well as the world. As there are several mastitis agents, antibiotic susceptibility testing also reveals varying results. Isolates from milk samples presented to our laboratory have revealed çalışmaları florfenicol, amoxicillin + clavulonic acid, ceftiofur, enrofloxacin, lincomycin+spectinomycin and gentamycin as prominent choices for antibiotic treatment. These results are mostly compatible with other studies in our country. Yeşilmen et al.(2012), have found cefaperazone and ampicillin to have the highest susceptibility rate in their work with subclinical mastitis cases. In another study in the Southeastern Anatolia, (Ergün et al. 2009) isolates were found to be susceptible to sulfamethoxazole+trimethoprim at a rate of 97.4% and this was found to be different from our results.

*E. coli* isolates from this work were found to be susceptible to florfenicol, gentamycin, lincomycin+spectinomycin and enrofloxacin. Other studies support these results. *E.coli* isolates in Turkey were still susceptible to enrofloxacin. Dursun and Kaya (2010) reported experimental treatment of 25 lambs with diarrhea and 20 of them were completely

healed within 2 days. Aydın et al. (2001), also reported that 21 *E. coli* isolates were found to be susceptible to enrofloxacin, danofloxacin, gentamycin, streptomycin, kanamycin and tetracycline.

In this work, gentamycin, florfenicol and ceftiofur were found to be the most effective antibiotics in poultry. While our findings comply with some reports (Kaya et al. 2008), they differ from others (Aydın et al. 2001). In a study carried out in the Isparta province *E. coli* isolates were found to be susceptible to Gentamycin at a rate of 82 % while 89 % of samples were susceptible to Amoxycillin, 87 % of *Klebsiella* spp. to Gentamycin and 64% of the same to Amoxycillin. In the same study, 35% of *Enterococcus* spp. were susceptible to streptomycin, 45% were to tetracycline, 55% to erythromycin, 61% to clindamycin, and 91% to chloramphenicol and ciprofloxacin. (Aydın et al. 2001), found out that within *E. coli* isolates from broilers; 37.5% of them were resistant to kanamycin, 100% to ampicillin and cefalotin, 87.5% to chloramphenicol, 81.25% to sulfamethoxazole-trimethoprim and erythromycin and 62.5% of them to amoxycillin+clavulonic acid, respectively. Differences between findings may be a result of regional differences. On the other hand, gentamycin was found to be the most effective antibiotic for poultry. The reason for this may be a lack of an oral solution for this antibiotic and the impracticality of adopting an injection method.

Fish isolates in this study were found to be most susceptible to florfenicol, flumequin, enrofloxacin and oxolinic acid. These results were found to be similar to other reports with the exception of oxytetracycline. Avsever and Ün (2014), in a previous study, reported that oxytetracycline resistance had been building up within the last ten years in the aquaculture sector. Still, this might also be due to regional differences as well. For example, in a study in the Aydın province (Akşit and Kum 2008), all 37 isolates (6 *Aeromonas salmonicida*, 13 *L. garvieae*, 7 *L. anguillarum* and 11 *Y. ruckeri*) were susceptible to florfenicol and enrofloxacin although there was resistance to others such as oxytetracycline and amoxycillin. Despite this; in another study carried out in the Marmara region on *Y. ruckeri*, *L. anguillarum* and *Pseudomonas fluorescens* isolates, they were found to be susceptible to oxytetracycline (Akaylı et al. 2013). Also, in an antibiotic susceptibility testing carried out by Özcan and Sarıyüpoğlu (2013) in the Elazığ province on *Flavobacterium psychrophilum* isolates obtained from trout samples; oxytetracycline was found to be more effective than enrofloxacin and florfenicol which also had strong inhibitory effect.

In this work, ceftiofur, amoxycillin + clavulonic acid, marbofloxacin, lincomycin+ spectinomycin were found to be highly effective against the bacterial isolates from cats and dogs. The studies in Turkey also support these findings. Babacan et al. (2011) have found that within *E.coli* isolates from urogenital infections of cats and dogs; 84.4% were susceptible to amoxycillin, 88.8% to cefalexin, 53.3% to cefalotin, 86.6% to ciprofloxacin, 75.5% to enrofloxacin, 97.7% to gentamycin, 71.1% to trimethoprim+sulfamethoxazole, 68.8 % to tetracycline and 64.4% to nalidixic acid. Also, Özkanlar et al. (2005), reported to have found *E. coli* and *Proteus mirabilis* isolates to be susceptible to cefadaxime, penicillin, ampicillin, enrofloxacin and trimethoprim.

Antibiotic susceptibility testing from alternative species were seen to yield better results than farm and companion animals. The reason for this might be due to their lack of

exposure to antibiotic treatment. On the other hand, in this study there have been few samples of this kind.

As a result, in this work, bacterial isolates and antibiotic susceptibility patterns from samples of cattle, sheep, goats, avian species, fish, cat, dog and other species submitted to the laboratory between 2013-2014 for disease diagnosis are presented with the aim of contributing to treatment options and to draw attention to increasing antibiotic resistance.

## REFERENCES

- Akan M, Kökcü L, Öncel T, Eken HS (2001). Mastitislerden izole edilen stafilkok suşlarının beta laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, 1(2), 31-34.
- Akaylı T, Ürkü Ç, Çanak Ö (2013). Kültür gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'ndan izole edilen Gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığı. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6, 11-15.
- Akşit D, Kum C (2008). Gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 19(1), 1-7.
- Alderman DJ, Smith P (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196, 211-243.
- Anonymous (2011). Antibiotic-resistant infections cost the US healthcare system in excess of \$20 billion annually [press release]. Boston, MA: Alliance for the Prudent Use of Antibiotics and bioMérieux; October 19, 2009. <http://www.prnewswire.com/news-releases/antibiotic-resistant-infections-cost-the-us-healthcare-system-in-excess-of-20-billion-annually-64727562.html>, Accessed February 14, 2011.
- Anonymous (2015). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Ruhsatlı veteriner ürünleri: <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/emliste.aspx>, Erişim tarihi: 09.01. 2015.
- Arda M, Minbay A, Aydın N (1982). Özel Mikrobiyoloji, bakteriyel infeksiyöz hastalıklar, A.Ü. Basımevi, AU Vet Fak Yayın No. 386, Ankara.
- Austin B, Austin DA (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish, 5th Edition Springer, New York, 978-94-007-4884-2pp.
- Avsever ML, Ün C (2014). Ege bölgesi'nde kültürü yapılan deniz balıklarından edilen *Listonella anguillarum* izolatlarının fenotipik özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Bornova Vet Bil Derg*, 36 (50), 1-8.
- Aydın F, Umur Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA (2001). Kars yöresindeki ishali buzağlardan bakteriyel ve paraziter etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 7 (1), 7-4.
- Babacan O, Akan M, İzgür M (2011). Kedi ve köpeklerin ürogenital sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Vet Hekim Derg*, 82 (1), 43-48.
- Baydan E, Yurdakök B, Aydın FG (2012). Balıklarda antibiyotik kullanımı antibiotic use in fish. *Jvet Sci*, 3 (3), 45-52.
- Boynukara B, Ekin İH, Aksakal A, Gulhan T (2002). Isolation and antibiotic susceptibility of enterococci from human, dog and cat faeces. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*. 2 (1), 37-42.
- Dégi J, Imre K, Herman V (2012). Frequency and characterization of *Streptococcus canis* strains isolated from dog and cat. *Bulletin Usamv*, 69(1-2), 1843-5262.
- Dinç G, Cengiz S, Söğüt M (2013). Tüketime sunulan alabalıklarda *Aeromonas hydrophila* varlığı ve antibakteriyel duyarlılıklarının saptanması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6 (2), 20-25.
- Erbaş G, Kaya O. (2008). Aydın ve izmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg*, 30 (44), 7-14.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğru E, Kireççi E, Sarıbay MK, Ateş CT, Ülkü A, Demir C (2009). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 33 (6), 477-483.
- Gifford GA, Andrew A, Potter A, Babiuk A (1988). Clinical and pathological evaluation of sulbaktam/ampicillin for treatment of experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Can Vet J*, 29, 142-148.
- Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM (2010). İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16 (5), 717-722.
- Gökçe G, Şahin M, Genç O, Sural E (1997). Buzağı pneumonilerinin tedavisinde tilmicosin ve danofloxacinin etkileri üzerinde karşılaştırmalı araştırmalar. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 3 (2), 151-155.

- Guler L, Gunduz K, Sarisahn AS (2013).** Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (5), 843-849.
- Gümüşsoy KS (2013).** Phenotypic and genotypic determination of antibiotic resistant and biofilm forming *Staphylococcus aureus* isolated in Erzincan tulum cheese. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (3), 517-521.
- Hong GE, Kim DG, Bae JY, Ahn SH, Bai SC, Kong IS (2007).** Species-Specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the *amib* gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. Source Department Of Biotechnology And Bioengineering, Pukyong National University, Busan, Korea, 608-737 pp.
- Kaya S, Çetin ES, Arıkan A, Tetik T, Kesbiç H, Yakar S (2007).** Tavuklardan izole edilen *E coli*, *Klebsiella* ve enterokoklarda antibiotik duyarlılık durumları. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 14 (2), 24-27.
- Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD (2000).** Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (2), 421-424.
- Kim EH, Aoki T (1996).** Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable r-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol*, 40, 665-669.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn WC (1997).** Color Atlas of Diagnostic Microbiology, fifth ed. Lippincott.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2000).** Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically- Fifth Edition: Approved Standard M7-A5, Nccls, Wayne, Pa, Usa.
- Önat K, Kahya S, Çarlı KT (2010).** Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turk J Vet Anim Sci*, 34(1), 91-94.
- Özcan M, Sarıyüpoğlu M (2013).** Elazığ yılındaki bazı alabalık işletmelerinde izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un antibakteriyel duyarlılıklarının incelenmesi. Yunus Araştırma Bülteni, (2), 11-19.
- Özkanlar YE, Şahal M, Kibar M, Özkök S. (2005).** Köpeklerde *Escherichia coli* ve *proteus mirabilis* ile oluşturulan aşağı üriner sistem enfeksiyonu ve veziköretoral reflüksle ilişkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 171-178.
- Öztürk D, Çorlu M (2006).** Pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıklar *bacteria* isolated from lungs of sheep with pneumonia and antibiotic susceptibilities. *Vet Bil Derg*, 22, 1-2: 59-63.
- Rajan PR, Lin JH, Ho MS, Yang H (2003).** Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida* by a PCR technique and plating method. *J Appl Microbiol*, 95, 1375-1380.
- Shin SJ, Kang SG, Nabin R, Kang ML, Yoo HS (2005).** Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against *bacteria* isolated from bovine and porcine respiratory disease. *Vet Microbiol*, 106 (1-2), 73-7.
- Tel OY, Keskin O (2010).** Koyun akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (1), 31-34.
- Tenover FC, Hughes JM (1996).** The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 275, 300-304.
- Toyama T, Kita TK, Wakabayashi H (1996).** Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16s ribosomal DNA. *Fish pathology*, 31(1), 25-31.
- Ülker H, Küçük D, Cantekin Z, Solmaz H (2012).** Hatay yöresinde kesimhanede kesilen sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2 (2), 10-14.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19 (24), 6823-6831.
- Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkuran S (2012).** Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (4), 24-29.
- Zhao GB, Ge J, De Villena R, Sudler E, Yeh S, Zhao, DG, White D, Wagner J (2001).** Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., Area. *Appl Environ Microbiol*, 67, 5431-5436.
- Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H (1998).** Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol*, 36, 983-985.







## Cloning of Outer Membrane Protein Gene Omp31 *Brucella melitensis*

Erman ORYAŞIN<sup>1</sup> Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes University, Recombinant DNA and Recombinant Protein Center (REDPROM), Aydın, Turkey

<sup>2</sup> Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey

Received: 09.04.2019

Accepted: 22.07.2019

### ABSTRACT

Brucellosis is one of the most important zoonotic diseases transmitted to humans from animals or animal products. *Brucella melitensis* is the most pathogenic species in the genus brucella. The outer membrane protein 31 (Omp31) of *B. melitensis* is considered to be a protective immunogen and an important candidate vaccine. In this study, cloning from *B. melitensis* Rev 1 strain of Omp31 coding gene (*omp31*) was aimed. *Brucella melitensis* REV-1 live vaccine strain was used in the study. After reactivation of strain, DNA was extracted from bacterial culture. Gene sequence which encodes outer membrane protein was obtained from Gene Bank. Primers were designed to clone this region. After primer design, the gene region amplified by the polymerase chain reaction was cloned into the pET28a expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 bacteria. Plasmid extraction was performed from *E. coli* BL21. The insert and plasmid were separately observed as a result of cutting with the restriction enzyme used for cloning. Expected size (790 bp) insert amplified with cloning primers again and amplicon was sequenced. The sequence obtained after sequencing analysis was compared to the gene bank and confirmed to be the outer membrane protein of *B. melitensis*. Further studies are required to investigate the antigenic properties of the cloned recombinant outer membrane protein Omp31 (rOmp31) and determine the potential to be a candidate for vaccination.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, Cloning, Omp31

### ÖZ

### *Brucella melitensis* dış membran protein geni Omp31'in klonlanması

Bruseloz hayvanlardan veya hayvansal ürünlerden insanlara bulaşan en önemli zoonotik hastalıklardan birisidir. *Brucella melitensis*, brusella cinsi içerisinde en patojen türlerden birisidir. *B. melitensis*'in dış membran proteini 31 (Omp31) koruyucu bir immünojen ve önemli bir aday aşı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan Omp31'i kodlayan genin (*omp31*) klonlanması amaçlandı. Çalışmada materyal olarak *B. melitensis* REV-1 canlı aşı suşu kullanıldı. Suşun canlandırılmasının ardından, DNA ekstraksiyonu yapıldı. Dış membran proteini kodlayan gen bölgesi, gen bankasından bulundu. Bu bölgeyi klonlamak için gerekli primerler manuel olarak dizayn edildi. Primer dizaynından sonra polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla çoğaltılan gen bölgesi, pET28a ekspresyon vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* BL21 bakterisine transformasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* BL21'den plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Klonlama için kullanılan restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda insert ve plazmid ayrı olarak gözlemlendi. Beklenen büyüklükte (790 bp) bulunan insert, tekrar klonlama primeri ile çoğaltılarak doğrulamak amacıyla sekans analizi yapıldı. Sekans analizi sonrasında elde edilen dizi gen bankası ile karşılaştırıldı ve insertin *B. melitensis* dış membran proteini olduğu doğrulandı. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarla da klonlanan rekombinant dış membran proteini Omp31 (rOmp31)'in antijenik özelliğinin araştırılarak aşı adayı olma potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella melitensis*, Klonlama, Omp31

### GİRİŞ

Bruseloz, Brusella etkenlerinin hayvanlarda özellikle genital organlara yerleşerek abortusa ya da infertiliteye sebep olduğu kronik seyirli, oldukça bulaşıcı ve yangısal reaksiyonlarla kendini gösteren bir hastalıktır. Tüm dünyada yaygın olmakla birlikte yurdumuzda da bildirilen hastalık, ekonomik kayıplara neden olmasının yanı sıra,

etkenlerin enfekte hayvanlardan insanlara kolaylıkla bulaşması hastalığın halk sağlığını tehdit eden bir zoonoz olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Hastalığın eradikasyonunun zor olması, insanlardaki tedavisinin uzun sürmesi ve pahalı olması, hayvanlarda ihbarı mecburi bir hastalık olması gibi nedenler hastalığın önemini artırmaktadır (GKGM 2012; OIE 2016). Aşılama brusellozu kontrol etmenin en etkili ve ekonomik yoludur.

Günümüzde *Brucella melitensis* Rev1, *Brucella abortus* S19 ve RB51 gibi zayıflatılmış suşlar evcil hayvanlarda brusellozu kontrol etmek için aşı suşu olarak kullanılmaktadır. Mevcut olan bu canlı aşılardan ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkilerin en önemlilerinden birisi aşı suşlarının insanlarda enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olmalarıdır. Son çalışmalar koruyucu bağışıklık mekanizmalarının çözülmesine ve etkili bir bruselloz aşısının geliştirilmesine odaklanmıştır (Vahedi et al, 2011; Shojaei et al. 2018).

Brusella dış membran proteinlerinin tanımlanması ve çalışılması, bu bakterilerin virulens özelliklerinin anlaşılmasında önemli bir adımdır. *Brucella sp.*'nin dış membran proteinleri (Omps) 1980'lerin başlarında tanımlanmıştır (Dubray ve Bezar 1980) ve immünojenik potansiyeli olan ve koruyucu antijenler olarak karakterize edilmiştir (Cassataro et al. 2007).

Moleküler ağırlıklarına göre üç Omp bildirilmektedir; Omp25 (25-27 kDa), Omp2b (36-38 kDa) ve Omp31 (31-34 kDa). Omp31 geninin *B. abortus* hariç bütün brusella türlerinde bulunduğu tespit edilmiş (Cloeckert et al. 2002) ve Omp31 serolojik olarak immünodominant bir antijen olarak bildirilmiştir (Kittelberger et al. 1995). Bu özellikler Omp31'i bruselloza karşı umut verici bir subunit aşı adayı olarak desteklemekte, bruselloza karşı aşı geliştirmek için potansiyel bir aday olarak önerilmesine sebep olmaktadır. İran'da yapılmış bir çalışmada da omp31 geninin saflaştırılıp bir aşı adayı olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Vahedi et al. 2011).

Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan Omp31'i kodlayan genin (omp31) klonlanması amaçlandı. Bu çalışmanın aşı veya hızlı tanı kiti geliştirmek gibi daha ileri çalışmalarda kullanılacak yerli ve bir ön çalışma olacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL ve METOT

**Brucella melitensis suşu:** Klonlama çalışmasında kullanılan *B. melitensis* suşu, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen liyofilize *B. melitensis* Rev.1 aşı suşunun canlandırılması ile elde edildi. Primerler: *B. melitensis* suşunun dış membran protein geni omp31'in klonlama amaçlı çoğaltılmasında bu çalışma için manuel olarak dizayn edilen aşağıda belirtilen primer çifti Tablo 1'de verilmiştir.

Bu primerlerin dizaynı için gen bankasından *B. melitensis*'e ait omp31 geni tarandı ve gene ait olan dizi üzerinde başlangıç kodonu ile stop kodonları işaretlendi. Dizayn edilen primerde bu bölgelerini içine almasına dikkat edildi. Klonlama işlemini sağlamak amacıyla dizayn edilen primerlere restriksiyon kesim bölgesi eklendi. Eklenen restriksiyon enziminin tanıma bölgesinin genin içerisinde olmamasına dikkat edildi.

**Plazmid:** *B. melitensis* suşundan çoğaltılan omp31 ampikonunun klonlanması için pET28a ekspresyon plazmidini ticari olarak temin edildi.

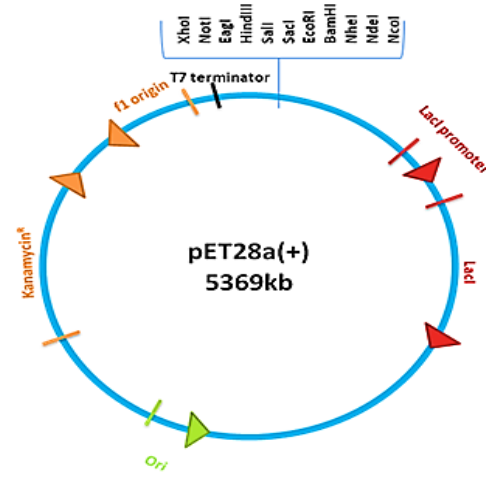
**Brucella melitensis suşundan total DNA ekstraksiyonu:** Ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGen Matrix, Bio-Rad) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'lar da degradasyon olup olmadığını kontrol etmek amacıyla DNA'lar 100 V'ta 45 dk. süre ile %1 agaroz içeren jelde yürütüldü. Elektroferez sonucunda, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve Russel, 2001). DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Nanodrop (Maestro) ile yapıldı.

Cihaz ile DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplandı. OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu gösterdi (Turner et al. 2004).

**Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):** Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, dNTP 0.2 mM, primer (her biri için) 0.4 pmol, Taq DNA polimerase 1.5 U olacak şekilde gerçekleştirildi.

PZR işlemi sonrasında hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip cihaz programlandı. Sikluslar 94 °C'de 4 dk. başlangıç denatürasyonu takiben; 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 52 °C'de 30 sn., 72 °C 60 sn. uzama toplam 35 siklus, 72 °C'de 8 dk. son uzama olacak şekilde ayarlandı. Yüz voltta 45 dakikalık elektroferez süresinin ardından SafeView Classic (ABMgood, USA) ile boyanan jel UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları değerlendirildi. Pozitif amplifikasyon görülen ampikonlar klonlama işlemi için -20 °C'de muhafaza edildi.

**pET28a içeren Escherichia coli BL21 suşundan plazmid ekstraksiyonu:** Plazmid Miniprep Kit (Fermentas, K0502) kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi. PZR ile *B. melitensis* suşundan çoğaltılan omp31 ampikonunun klonlanması için seçilen pET28a ekspresyon plazmid vektörünün yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. pET28a plazmidinin yapısı (5369 bp)

Figure 1. Construction of pET28a (5369 bp)

**pET28a plazmidini ile klonlanacak omp31 genini içeren ampikonların restriksiyonu:** İzolasyonu yapılan pET28a plazmid DNA'sı ile restriksiyon kesim yerleri eklenmiş modifiye primerler ile çoğaltılan omp31 geni ampikonları *EcoRI* endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Kullanılan primerlere klonlamayı yapabilmek amacıyla eklenen *EcoRI* endonükleazı genom üzerinde 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyan ve DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan enzimdir. pET28a plazmid DNA'sının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Tablo 2'de, omp31 fragmanını içeren ampikonun *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyon bileşenleri ise Tablo 3'de verilmiştir. Kesim reaksiyonları 37°C'de yaklaşık 30 dk. inkübe edildikten sonra 5'er µl'leri alındı ve DNA markırı ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelendi. Geriye kalan reaksiyon ürünleri presipitasyon ile saflaştırıldı (Sambrook ve Russel 2001).

**pET28a plazmidini ile klonlanacak omp31 genini içeren ampikonun ligasyonu:** Presipitasyon aşamasında birleştirilmiş pET28a vektörü ile ampikon ligasyona hazır

hale getirildi. *omp31* geni amplikonu ile pET28a vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri Tablo 4’de verilmiştir. Elde edilen ligasyon reaksiyonu 22°C’de bir gece inkübe edildi. Daha sonra ligasyon ürünleri için de presipitasyon işlemi uygulanarak enzim ve diğer kimyasallar gibi inhibitörlerden arındırıldı. Son olarak ligasyon karışımı *E. coli* BL21 bakterisine transferde kullanılmak üzere 10 µl steril distile su ile sulandırıldı ve transformasyona kadar -20 °C’de saklandı.

**Elektrokompetan *E. coli* BL21 hücrelerinin hazırlanması:** Kompetan bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* BL21 bakterisi daha önce bildirilen protokol uygulanarak kompetan hale getirildi ve ligasyon reaksiyon ürünü ile elektrotransformasyonda kullanıldı (Sambrook ve Russel 2001).

**Kanamisin içeren seçici besiyerinin hazırlanması:** Plaklarda rekombinantların seçimine dayalı besiyeri içerisine pET28a vektöründe yer alan kanamisin direnci ile ayırım için 50 µg/ml olacak şekilde kanamisin ilave edildi.

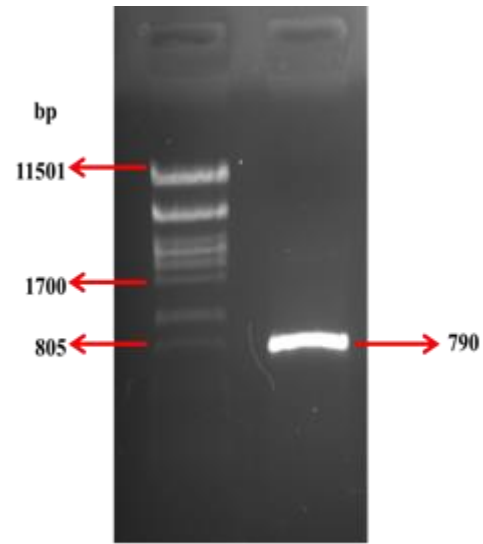
**Ligasyon ürünlerinin elektrotransformasyonu:** *omp31* genini taşıyan amplikon ile ligasyonu yapılan pET28a vektöründen 10 µl, hazırlanan *E. coli* BL21 kompetan hücresinden ise 100 µl alınarak aynı tüpte birleştirildi ve elektrotransformasyon küvetine alındı. Daha sonra elektrotransformasyon küveti elektroporatör cihazına (Thermo, Micropulser) yerleştirilerek kapasitansı 15 µF’e, rezistans 335Ω’a ve voltaj 2.5 KV’a getirilip elektrik şoku verildi. Elektrik şokundan hemen sonra cihazdan alınan küvet içerisine 1 ml Tryptic Soy Broth (TSB) eklenerek steril bir Ependorf tüpü içerisinde 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası her bir transformasyon için seçici kanamisin içeren besiyerine 50 ve 200’er µl’lik hacimler halinde yayma ekim yapıldı. Ertesi gün seçici besiyeri üzerinde üreyen koloniler değerlendirilmeye alındı.

**İnsert alan rekombinant plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması:** Seçici kanamisinli besiyeri plaklarında üreyen pET28a plazmid içerisine hedef DNA fragmanının (*omp31* geni) eklendiği düşünülen koloniler seçildi ve klonlama için kullanılan primerler ile PZR yapılarak kontrol edildi. Ayrıca PZR sonucunda pozitif olan koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren TSB broth besiyerinde 37 °C’de inkübe edilerek geliştirildi. Tüpte üreyen transformantlardan plazmid ekstraksiyonu yapılarak klonlamak için kullanılan *EcoRI* enzimiyle kesilerek, elektroforezi yapıldı ve plazmid ile insert incelendi.

**Sekans analizi:** Seçici kanamisinli besiyerinden seçilen klonların doğrulanması yapıldıktan sonra elde edilen klondan klonlama primerleri ile PZR yapıldı ve sekans analizi için özel bir firmaya (Macrogen, Güney Kore) gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben sekans analizini gerçekleştirdi. Fasta formatında tarafımıza gönderilen bu sekans gen bankası (NCBI) ile karşılaştırıldı. Bunun için Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı.

## BULGULAR

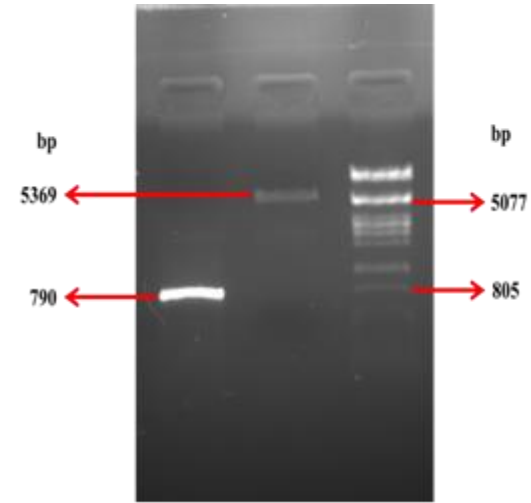
***omp31* geninin PZR amplifikasyonu:** Çalışmada kullanılan *B. melitensis*’e ait *omp31* geninin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler ve belirtilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen PZR sonrası elde edilen amplikonun elektroforez sonrası jel görüntüsü Şekil 2’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.** *omp31* geninin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PZR

**Figure 2.** Amplification of *omp31* gene

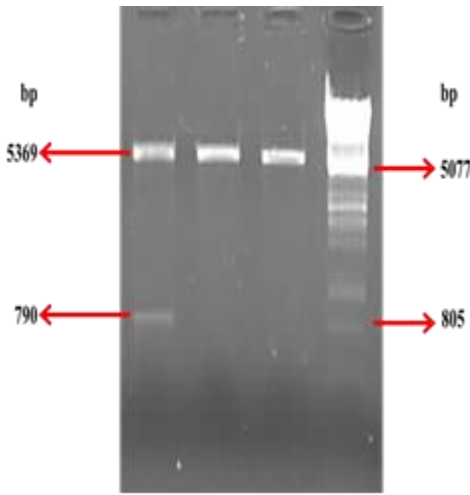
Çoğaltılan *omp31* geni ve pET28a vektörü restriksiyonu: Amplifikasyonu gerçekleştirilen *omp31* geninin ve klonlama vektörü olan pET28a’nın kesimleri gerçekleştirildi. Bu amaçla dizayn edilen primerlere eklenen restriksiyon tanıma bölgelerinden *EcoRI* enzimi ile hem amplikon hem de pET28a plazmidini ayrı ayrı restriksiyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3).



**Şekil 3.** *omp31* geni ve pET28a vektörüne ait restriksiyon elektroforez görüntüsü

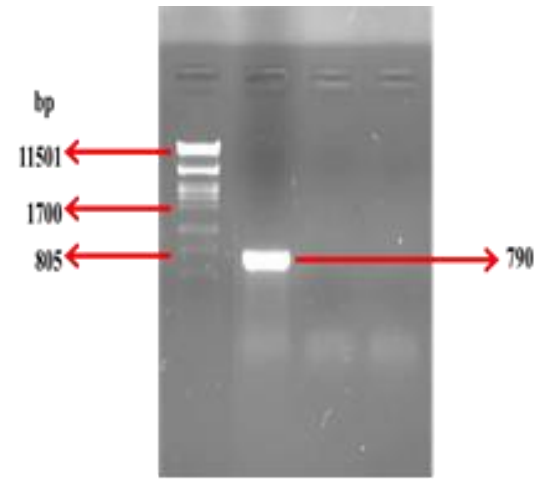
**Figure 3.** Electrophoresis of *omp31* gene and pET28a

**Restriksiyon sonrası ligasyon ve transformasyon:** Restriksiyon reaksiyonundan sonra ürünlerin ligasyonu yapıldı ve ardından transformasyon sonrası elde edilen rekombinant bakteri kolonileri kanamisin içeren Tryptic Soy Agar besiyerinde seçildi. Seçim sonrası rekombinant kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak restriksiyon ile insert ve vektör kontrol edildi. Bu amaçla elde edilen plazmid *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Restriksiyon sonrası insert ve plazmid birbirinden ayrılarak lineer halde jelde iki bant oluşturdu. Bu profile uyan numaralandırılmış klonlar PZR sonrası sekans analizi ile doğrulanmak amacıyla stoklandı.



**Şekil 4.** Seçilen transformantlardan plazmid restriksiyonu. İlk sıradaki klonda restriksiyon sonrası insert ve plazmid açığa çıktığından doğru klon olarak seçildi

**Figure 4.** Plasmid restriction from selected transformants Şekil 4'de görüldüğü gibi restriksiyon sonrası A klonunun beklenen büyüklükteki (790 bp) inserti aldığı tespit edildi. Sonrasında yine aynı koloniden PZR yolu ile klonlama için kullanılan primerler ile amplifikasyon yapılarak doğru büyüklükte olup olmadığı incelendi (Şekil 5)



**Şekil 5.** Seçilen klonların PZR ile doğrulanması

**Figure 5.** PCR confirmation of selected clones

*Sekans analizi ile seçilen klonun doğrulanması:* PZR amplifikasyonu sonrası sekans analizine gönderilen amplicon Gen Bankası ile karşılaştırılarak çoğaltılan ürünün *omp31* genine ait olup olmadığı kontrol edildi. Bu amaçla fasta formatında gelen DNA dizisi BioEdit programı ile açılarak <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> adresine girildi ve BLAST analizi gerçekleştirildi. Gen bankasında ACV07678.1 no'lu dizi %99,58 oranında benzerlik gösterdiği bulundu. Analize ait şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 6, Şekil 7).

**Tablo 1.** *B. melitensis omp31* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler

**Table 1.** The primer sequences used in PCR assays for *B. melitensis omp31* gene

Primer	Dizi (5'-3')	Hedef Gen	Ürün uzunluğu(bp)	Tm (°C)
Omp31FEco	AAGAATTCACAGACTTTTTCGCCG			48
Omp31REco	TTGAATTCCGTGGATTAGAACTTGTAG	omp31	790	54

**Tablo 2.** pET28a plazmid DNA'sının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu

**Table 2.** Restriction reaction of pET28a plasmid with *EcoRI*

İçerik	Alınan Miktar ( µl)
pET28a plazmid DNA'sı	10
Fast Digest Buffer	2
<i>EcoRI</i>	1
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1
Deionize Su	6
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

**Tablo 3.** *omp31* geni ampliconunun *EcoRI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu

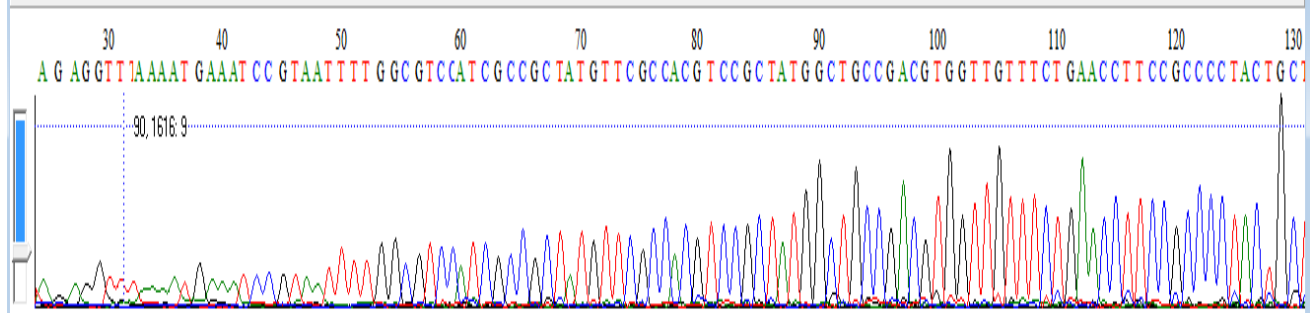
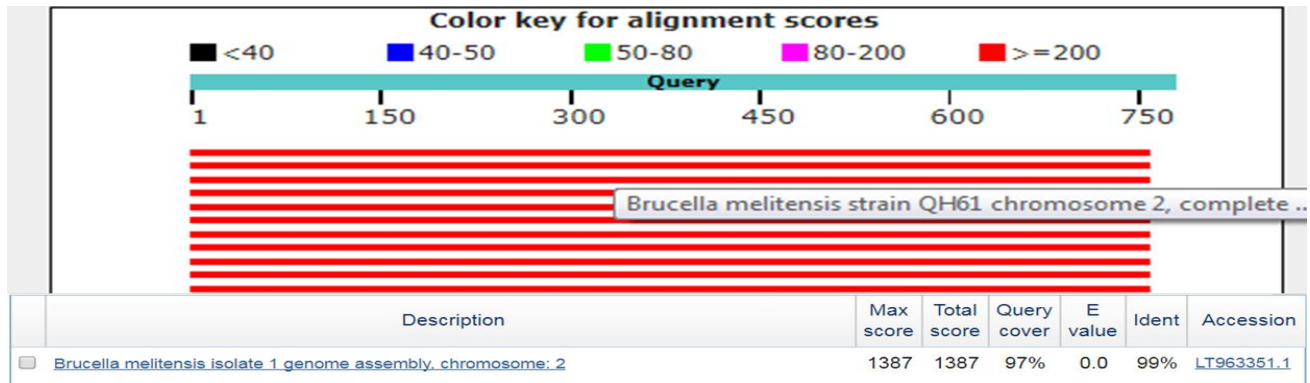
**Table 3.** Restriction of *omp31* gene amplicon with *EcoRI* endonucleases

İçerik	Alınan Miktar ( µl)
<i>omp31</i> geni ampliconu	10
Fast Digest Buffer	2
<i>EcoRI</i>	1
Deionize Su	7
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>



**Tablo 4.** omp31 geni ampliconu ile pET28a vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri**Table 4.** Ligation reaction components for pET28a plasmid and omp31 gene amplicon

İçerik	Alınan Miktar
omp31 geni + pET28a plazmidi	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20 µl</b>

**Şekil 6.** Seçilen klonun (rOmp31) PZR sonrası sekans analizi**Figure 6.** Sequence analysis of rOmp31**Şekil 7.** Sekans datasının gen bankası ile karşılaştırılması**Figure 7.** Comparison of sequence data with gene bank

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hasta ya da portör hayvanların tespit edilmesi, bakteriyolojik identifikasyon, serolojik teşhis ve aşılama bruselloz eradikasyonunda kullanılan en pratik yöntemlerdir. Günümüzde brusellozdan korunmak için kullanılan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* REV-1 gibi canlı attenüe aşuların pek çok dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin bu aşular gebe hayvanlarda abortuslara sebep olabileceği gibi insanlar için de virulandır. Bununla birlikte S koloni oluşturan aşı suşları ile virülen suş antijenik olarak benzer olduğu için buna karşı oluşan antikorları ölçen serolojik testler ikisini ayırt edemezler. Bunun sonucunda da yapılan serolojik incelemelerde hayvanın hasta mı yoksa aşı ile korunmakta mı olduğu anlaşılammaktadır (Monreal et al. 2003).

Bu nedenle, bu suşlar ile hazırlanan canlı attenüe tam bakteri aşuları yerine, bakterinin dış membran proteinlerinden birisi ile hazırlanan aşuların kullanılması hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalığa neden olma riski taşımayacağından oldukça önemlidir. Omp31 serolojik olarak immünodominant bir antijen olarak bilinmektedir (Kittelberger et al. 1995). Bu nedenle

Omp31 bruselloza karşı potansiyel, ilginç ve umut verici bir alt birim aşı adayıdır. Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan dış membran proteinlerinden birisi olan omp31'i kodlayan gen olan omp31, pET28a ekspresyon plazmidi içerisine klonlandı. PZR amplifikasyonu sonrası da sekans analizi ile elde edilen ürünün omp31 genine ait olduğu doğrulandı. Bu çalışmamızda seçilen *B. melitensis* REV-1 aşı suşunun seçilme nedeni suşun dış membran proteinlerinin brusella enfeksiyonu sırasında önemli bir rol oynaması ve konak bağışık yanıtını indüklemesidir. Bu da, bu suşun aşı çalışmaları için bakterinin kullanılabilir bir komponenti olduğunu göstermektedir (Ding et al. 2005).

Daha önce yapılmış bir çalışmada omp25 ve omp31 genlerinin bağışık yanıt oluşturabilme gücünü belirleyebilmek amacıyla, hem *B. melitensis* ve *B. ovis* hem de membran proteinleri ile farelerde enfeksiyon oluşturulmuştur. Orijinal suşların oluşturduğu bağışıklık yanıtı ile membran proteinlerinin oluşturduğu bağışıklık karşılaştırılmış ve koruyuculuk düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Böylece bu proteinlerin, aşı olarak kullanıldıkları takdirde bağışıklık yanıtı oluşturacakları ayrıca serolojik testler ile tanıda hasta veya

aşılı hayvanların ayırt edilmesini sağladığı da bildirilmiştir (Cloekaert et al. 2002).

İnsan enfeksiyonlarını durdurmak için hayvanlarda bruselloz kontrol ve eradikasyon tedbirlerinin uygulanması gerekmektedir. Yeni aşuların yapılmasına yönelik ilk pratik adımlar aşı adaylarının üretilmesi, ekstraksiyonu ve saflaştırılmasıdır. Bu çalışmada rOmp31 başarı ile saflaştırılmıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarla da, bu klon araç olarak kullanılarak, aşı adayı olarak iyi bir rekombinant klon olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

## TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, VTF-16008 kod numaralı proje desteği için Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, laboratuvar çalışmalarını esnasındaki katkılarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN' a teşekkür eder.

## KAYNAKLAR

- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, et al. (2007). A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine*, 25, 4437-46.
- Cloekaert A, Jacques I, Grilló MJ, et al. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, 29, 2827-35.

- Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet JY, et al. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90, 229-47.
- Ding XZ, Bhattacharjee A, Nikolich MP, et al. (2005). Cloning, expression, and purification of *Brucella suis* outer membrane proteins. *Protein Expr Purif*, 40, 134-41.
- Dubray G, Bezard G (1980). Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann Vet Res*, 11, 367-73.
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (2012). Brusellanın konjunktival aşı ile kontrol ve eradikasyonu projesi. Genelge No: 2012/03.
- Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, et al. (1995). Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J Vet Diagn Invest*, 7, 210-8.
- Monreal D, Grilló MJ, González D, et al. (2003). Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun*, 71, 3261-71.
- Office International des Epizooties (OIE) (2016). World Organization for Animal Health: Chapter 2.1.4. Brucellosis. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf).
- Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shojaei M, Tahmoorespur M, Soltani M, et al. (2018). In silico cloning and bioinformatics study of *Brucella melitensis* Omp31 antigen in different mammalian expression vectors. *J Livest Sci Technol*, 6, 65-76.
- Turner PC, McLennan AG, Bates AD, et al. (2004). *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*. Nobel Yayınları.
- Vahedi F, Talebi AF, Ghorbani E, et al. (2011). Isolation, cloning and expression of the *Brucella melitensis* Omp31 gene. *Iran J Vet Res*, 12, 156-62.





## The Effect of Clove on Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Probiotic Yogurt

Ayşe BAYIR Mehmet Gültekin BİLGİN

Bezmialem University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Department, Istanbul, Turkey

Received: 11.04.2019

Accepted: 20.07.2019

### ABSTRACT

In this study, the effects of clove added in different concentrations to the probiotic yogurts on some microbiological, chemical and sensory properties of yogurts were investigated. Probiotic yogurts were produced using yogurt and probiotic cultures. Four groups were established, including a control group and groups clove 1, clove 2 and clove 3, and 0%, 0.1%, 0.3% and 1% powdered clove were added to the groups, respectively. Gas chromatographic analysis of the clove used in the study was performed. The addition of clove to probiotic yogurt showed antibacterial activity on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* while clove depending on its concentration was found to support bacterial growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* ( $P < 0.05$ ). In addition, pH, fat-free dry matter and fat content of yogurts were affected depending on the clove concentrations. When the sensory qualities were scored such as appearance, consistency, smell and taste of yogurts, the scores of cloves-added (0.1% and 0.3%) probiotic yogurts were closer to the control group. These results have shown that the clove added probiotic yogurt increases the microbial and chemical quality of the product, and but it had a limited positive effect on its sensory properties.

**Keywords:** Clove, Probiotics, Yogurt, Yogurt bacteria

### ÖZ

### Probiyotik Yoğurdun Mikrobiyolojik, Kimyasal ve Duyusal Özellikleri Üzerine Karanfilin Etkisi

Bu çalışmada, probiyotik yoğurda katılan farklı konsantrasyonlardaki karanfilin, yoğurdun bazı mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşsal özellikleri üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada yoğurt ve probiyotik kültürler kullanılarak probiyotik yoğurtlar üretildi. Gruplandırma kontrol, karanfil 1, karanfil 2 ve karanfil 3 olmak üzere 4 grup şeklinde yapıldı ve gruplara sırasıyla %0, %0.1, %0.3 ve %1 toz haline getirilmiş karanfil ilave edildi. Çalışmada kullanılan karanfilin gaz kromatografik analizi yapıldı. Probiyotik yoğurda karanfil ilavesinin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus acidophilus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* üzerinde ise karanfilin konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriyel gelişimi destekleyici etkide bulunduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). Ayrıca, karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak yoğurtların pH, yağsız kuru madde ve yağ miktarları da etkilenmiştir. Yoğurtların görünüşü, kıvamı, kokusu ve tadı gibi duyuşsal özellikleri puanlandırıldığında karanfil (%0.1 ve %0.3) katkılı probiyotik yoğurtların puanları kontrol grubuna yakın çıkmıştır. Bu sonuçlar, probiyotik yoğurda katılan karanfilin, ürünün mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesini artırdığını, duyuşsal özellikler üzerine ise sınırlı düzeyde olumlu etkisinin olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Karanfil, Probiyotikler, Yoğurt, Yoğurt bakterileri

### GİRİŞ

Fonksiyonel besinler; nutrasötik, besin destekleri, tasarlanmış gıdalar, özel beslenme amaçlı besinler veya farmakolojik besinler olarak da adlandırılmaktadır (Kıyak ve ark. 2014). Fonksiyonel besinler, bazı hastalıkların oluşma riskini azaltarak sağlığa olumlu etki etmek suretiyle optimal sağlık koşullarını oluşturmaya yardımcı olmaktadır (Granato ve ark. 2017). Fonksiyonel

besinlerin, başta kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azaltma olmak üzere gastrointestinal sistemi düzenleme, üriner sistemin sağlığını koruma, kan basıncını düşürme ve menopoş semptomlarını azaltma gibi çeşitli yararlarının bulunduğu tespit edilmiştir (Begum ve ark. 2017). Probiyotik, klasik olarak konakçının barsak yollarını olumlu yönde etkileyen 'yaşayan bir mikrobiyal besin takviyesi' olarak tanımlanmaktadır (Roberfroid

2000). Probiyotik bakteriler bağışıklık sistemini güçlendirmekte, fekal enzimler ile mutajeniteyi azaltıcı, kolesterolü düşürücü, hastalık riskini azaltıcı ve laktoz sindirimini artırarak laktoz intolerans semptomlarını azaltıcı etkiler göstermektedirler. Antimikrobiyal, antimutajenik ve antikarsinojenik aktivitelerinden dolayı, diyare, atopik dermatit, nekrotizan enterokolit, psödomembranöz kolit, kronik karaciğer hastalığı, alerjik hastalıklar ve gıda allerjileri gibi problemlerin tedavisinde probiyotikler önerilmektedir (Kopp-Hoolihan 2001).

Yoğurt, sağlığın korunması ve iyileştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte klasik yoğurt tüketildiğinde yoğurdun starter kültürlerinin çoğu bağırsaklardaki alkali ortam nedeniyle uzun süreli yaşayamaz (Sanches ve ark. 2009). Bu durum, yoğurdun profilaktik kullanımını sınırlamış ve farklı probiyotik formülasyonları ile farklı yoğurt üretimlerinin araştırılmasına yol açmıştır. Bir besinin probiyotik ürün olmasını tıbbi aktivitesi, aktif hücre sayısı veya canlı hücrelerinin toplam sayısı etkilemektedir (Begum ve ark. 2017).

Probiyotik gıda için en az  $1.0 \times 10^6$  kob/g yaşayan probiyotik mikroorganizma gereklidir (26 Ocak 2017 tarihli Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği). Son yıllarda en çok da *Lactobacillus* ve *Bifidobakterilerin* bir arada olduğu probiyotik kültürler yoğurta kullanılmakta ve bu da yoğurdun terapötik ve profilaktik değerini artırmaktadır (Lourens-Hattingh ve Viljoen 2001).

Karanfil baharatı (*Syzygium aromaticum*), *Myrtaceae* familyasına ait bir ağacın kurutulmuş tomurcuğu olup antik çağlardan beri birçok hastalık için tamamlayıcı bir tedavi olarak kullanılmıştır (Mishra ve Singh 2013). Yapılan bir araştırmada, genel olarak antioksidan, antimikrobiyal, insektisit, antidiyabetik, antiinflamatuvar, anti-trombotik ve analjezik etkileri bildirilmiştir (Milind ve Deepa 2011).

Karanfil yağının veya ekstraktının antibiyotiklere dirençli bakteriler ve patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkileri ile ilgili çalışmalar (Nascimento ve ark. 2000; Mytle ve ark. 2006; Cava ve ark. 2007) bulunmakla birlikte probiyotik bakteriler üzerine etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer yandan, süt ve yoğurdun tamponlama kapasitesinin karanfilin asitliliğini nötralize etmesiyle, karanfilin *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etki göstermediği, ancak süt ve yoğurdun duyu kalitesine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Hammad 2016).

Bu çalışmada; farklı konsantrasyonlarda karanfil ile zenginleştirilmiş probiyotik yoğurtlar üretilip, karanfilin bu yoğurtların mikrobiyolojik, kimyasal ve duyu özellikleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Karanfil ve GC-MS analizi

Çalışmada kullanılan karanfil, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Fitoterapi Merkezi'nden (İstanbul, Türkiye) elde edilmiş ve yine aynı merkezde karanfil toz haline getirilip GC-MS (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi) (Agilent 5977A, USA) yöntemiyle karanfilin kimyasal bileşenleri araştırılmıştır.

Kullanılan GC-MS sisteminin koşulları şöyledir:

- enjeksiyon hacmi (5 µl),
- giriş sıcaklığı (250 °C),
- split oranı (50:1),
- kolon (DB-WAX 60 m x 0,25 x 0,25),
- akış (1 mL/dk He) ve

- sıcaklık programı (10 °C/dk sıcaklık artışı, 70 °C ve 5 dk bekleme süresi, 230 °C ve 29 dk bekleme süresi).

### Yoğurdun hazırlanışı

Probiyotik yoğurt yapımında kullanılan pastörize inek sütleri (%3 yağ) marketten satın alınmıştır (Dost süt, Türkiye). Normal yoğurt ve probiyotik yoğurt starter kültürleri (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) ticari olarak elde edilmiştir (Maysa Gıda, Adana, Türkiye).

Pastörize süt, 45 °C'ye kadar ısıtılıp starter kültür ve farklı konsantrasyonlarda karanfil (%0 Kontrol grubu, %0.1 karanfil 1 grubu, %0.3 karanfil 2 grubu ve %1 karanfil 3 grubu) ilave edildi. Her bir grup 3 kere tekrarlandı. Ürünlere katılan starter kültür miktarı ve inkübasyon sıcaklığı kültür temin edilen firmanın önerisi doğrultusunda ayarlanmıştır. Buna göre, 45 °C'ye kadar ısıtılan 1/2 litre pastörize süte 0.5 g probiyotik yoğurt mayası (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) ve 0.25 g yoğurt mayası (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) kültürleri tartılarak süte karıştırılmıştır. Kültürler süte karıştırılıp eritildikten sonra, sütler yoğurda dönüşmek üzere 45 °C'de 6 saat inkübe edilmişlerdir. Probiyotik yoğurtlar inkübasyon sonrasında +4 °C'de 24 saat olgunlaştırılıp mikrobiyolojik, kimyasal ve duyu analizleri yapılmıştır.

### Mikrobiyolojik Analizler

Analizlerde kullanılan pepton, MRS (De Man Rogosa and Sharpe), M17, TOS-MUP (Transgalactosylated oligosaccharidesmupirocin lithium salt), MRS-CC (MRS-clindamycin-ciprofloxacin) besiyerleri ticari olarak elde edildi (Merck, Türkiye). Bu besiyerleri sırasıyla, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* bakterilerinin tanısı için kullanıldı. Probiyotik yoğurtların mikrobiyolojik analizleri IDF ve ISO standartlarına göre yapıldı (ISO ve IDF 2006; 2010).

Her bir deneysel gruptan aseptik şartlarda tartılan 10 g yoğurt, steril poşetlerde (Steril Stomacher Bag, VWR, Türkiye) 90 mL %0.1'lik peptonlu su ile dilüe edilip Stomacher'de (VWR, İtalya) homojenizasyonu sağlandı. Böylece, ilk dilüsyon ( $10^{-1}$ ) elde edilip bundan da  $10^{-7}$ 'ye kadar dilüsyon serisi hazırlandı. Her bir dilüsyondan 100 µL alınıp yukarıda adı geçen besiyerlerine ekildi (Süle ve ark. 2014).

Ekilen MRS, MRS-CC ve TOS-MUP besiyerleri 72 saat boyunca anaerobik ortamda 37 °C'de inkübe edildi (Memmert, IN 110, Almanya). Anaerobik şartlar, anaerobik jar ve ilgili kitleri kullanılarak sağlandı (Merck, Darmstadt, Almanya). M17 besiyerleri ekim sonrası aerobik ortamda 45 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerlerinin değerlendirilmesinde koloni sayacı (Interscience, Scan 100, Fransa) kullanıldı.

MRS besiyerinde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, M17 besiyerinde *Streptococcus thermophilus*, TOS-MUP besiyerinde *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* ve MRS-CC besiyerinde *Lactobacillus acidophilus* bakterilerinin tanısı gerçekleştirildi. Sadece 25-250 koloni bulunan besiyerleri değerlendirmeye alındı (Süle ve ark. 2014). Örneklerdeki bakteri sayıları kob/g olarak hesaplandı.

### Kimyasal Analizler

**Yağın Kantitatif Analizi:** Her bir yoğurt numunesinden 50 g hassas terazide (Ohaus Company, USA) tartılıp 5 mL

amonyak (Merck %28-30) ilave edilip karıştırıldı. Her bir numune iki kere çalışıldı. Bunun için 2 bütirometre (Funke Gerber, %0.1'lik hassasiyet) alındı ve her birine önce 10'ar mL sülfürik asit (Merck %90, d = 1.82) ve sonra 11'er mL hazırlanan yoğurt-amonyak karışımından konuldu. Üzerine 1'er mL N-amil alkol (Merck %100, d = 0.815) ilave edildi. Bütirometreler 5 dk boyunca Gerber santrifüjünde (Funke Gerber Almanya, T = 65 °C, 1350 rpm) santrifüj edildi. Bütirometreler santrifüj işleminden sonra 63 °C su banyosunda (J.P.Selecta, İspanya) 10 dk bekletilip 5 dk daha santrifüj edildi. Sonuçlar bütirometre taksimatından okunup kütlece yüzde cinsinden yağ oranı hesaplanmıştır (Tekinşen ve ark. 2002).

**Yağsız Kuru Madde Analizi:** Kapaklı petri kutularına bir miktar deniz kumu (Merck, Türkiye) eklenerek etüvde (Binder, ED 115, Almanya) 103 °C'de kurutulması sonrasında bir desikatörde soğutuldu ve hassas terazide (Ohaus, USA) tartıldı. Homojenleştirilmiş yoğurt numunesinden 3 g petri kutusuna aktarılıp etüvde 103 °C'de 2 saat süreyle kurutuldu ve daha sonra bir desikatörde soğutuldu. Elde edilen numune hassas terazide tartılıp yüzde miktarı m/m olarak kütlece hesaplanmıştır (Tekinşen ve ark. 2002).

**Protein Miktar Analizi:** Deneysel yoğurt gruplarının protein miktarı formol titrasyon metoduyla yapılmıştır (TS 1330/Nisan 2006). Yoğurt numunesinden 50 g tartılıp (Ohaus, USA) üzerine 50 mL destile su ilave edildi. Daha sonra 0.5 mL %2 fenolftalein (Merck, Türkiye) ve 2 mL doymuş potasyum oksalat (Merck, Türkiye) eklendi ve karıştırıldı. Karışım 2 dk sonra 0.1 N sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Türkiye) ile hafifçe pembe renk elde edilene kadar titre edildi. Daha sonra karışıma 10 mL formaldehit (Merck, Türkiye) ilave edilip karıştırıldı. Karışım 1 dk bekledikten sonra yine pembe renk elde edilene kadar 0.1 N NaOH ile titre edildi. Son olarak titre edilen 0.1 N NaOH çözeltisi miktarları ile protein miktarı hesaplanmıştır.

**Titrasyon Asitliği Tayini:** Deneysel yoğurt gruplarından 10 g numune tartılıp üzerine 10 mL destile su eklendi. Karışıma 0.5 mL fenolftalin (Merck, Türkiye) ilave edilip 0.1 N NaOH ile yaklaşık 30 sn süresince kaybolmayan pembe bir renk alana kadar titre edildi. Sarfedilen 0.1 N NaOH miktarı ile titrasyon asitliği hesaplanmıştır (Tekinşen ve ark. 2002).

**pH tayini:** Yoğurt numunelerinin pH değerleri kalibrasyonu yapılmış, xerolyt polymer elektrolit dolgulu, ısı sensörlü bir pH metre ile (Mettler-Toledo, Switzerland) ölçülmüştür (Cemeroğlu 2013).

#### Duyusal analiz

Yapılan probiyotik yoğurtlar araştırmacılar tarafından Türk Standartları'na göre ve kör olarak değerlendirildi (TS 1330/Nisan 2006; TS 1018/Nisan 2002). Genel olarak yoğurt, TS 1330 Yoğurt Standardı değerlendirmesinin görünüş, kıvam, koku ve tat açısından özelliklerine uymalı ve her bir özellikten en az 4 puan ve toplamda 16 puan almalıdır.

#### İstatistiksel analiz

Toplamda 12 adet probiyotik yoğurt numunesinden elde edilen veriler, SPSS 16.0 istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneysel grupların mikrobiyolojik ve kimyasal analiz sonuçlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ve istatistiksel farklılığın olup olmadığını saptamak için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. P değeri 0.05'e eşit veya daha düşük bulunduğu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Grupların ikili karşılaştırmaları için Bonferroni düzeltmesi kullanılarak post hoc analiz yapılmıştır. Duyusal analiz sonucu elde edilen veriler, her bir grup için toplam puan olarak hesaplandı. Niceliksel verilerin aritmetik ortalaması ve standart sapmaları hesaplanıp sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

#### BULGULAR

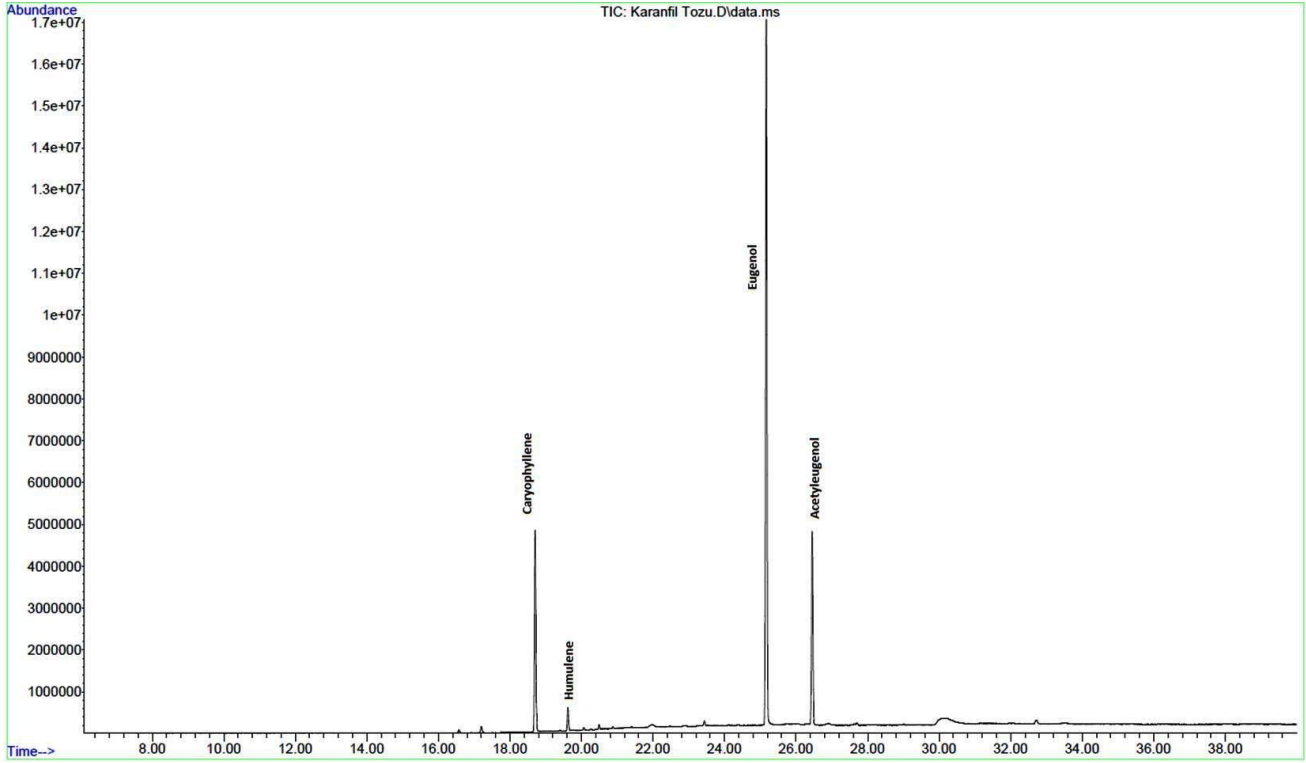
Toz haline getirilmiş olan karanfilde bulunan uçucu yağlar yüksek miktardan az miktara doğru sırasıyla şöyle bulunmuştur: Eugenol (%62.152), Acetylenol (%17.543), Caryophyllene (%17.049), Humulene (%1.847), Alfa coapene (%0.613), Cadinene (%0.371) ve diğerleri (%0.426). Karanfil tozunun uçucu yağ analizlerinin GC-MS kromatogramı uçucu yağların isimleriyle birlikte Şekil 1'de gösterilmiştir.

*Streptococcus thermophilus* sayısı, kontrol grubu probiyotik yoğurtta karanfil katkılı yoğurtlara göre önemli oranda yüksek çıkmıştır (P<0.05) (Şekil 2a). Diğer yandan karanfil katkılı gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında, artan karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak bu bakterinin de sayısının arttığı tespit edilmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısı, kontrol grubu probiyotik yoğurtta karanfil 1 ve karanfil 2 gruplarından daha yüksek iken karanfil 3 grubundan ise düşük bulunmuştur (Şekil 2b). Sadece kontrol grubu ile karanfil 1 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (P<0.05). Probiyotik bakterilerden *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* sayısı kontrol grubu probiyotik yoğurtta istatistiksel olarak karanfil 1 grubundan önemli düzeyde yüksek (P = 0.001) bulunmuş iken karanfil 2 ve karanfil 3 gruplarıyla anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 2c). Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus acidophilus* sayısı, kontrol grubu probiyotik yoğurtta karanfil katkılı yoğurtlara göre önemli oranda yüksek çıkmıştır (P = 0.001) (Şekil 2d).

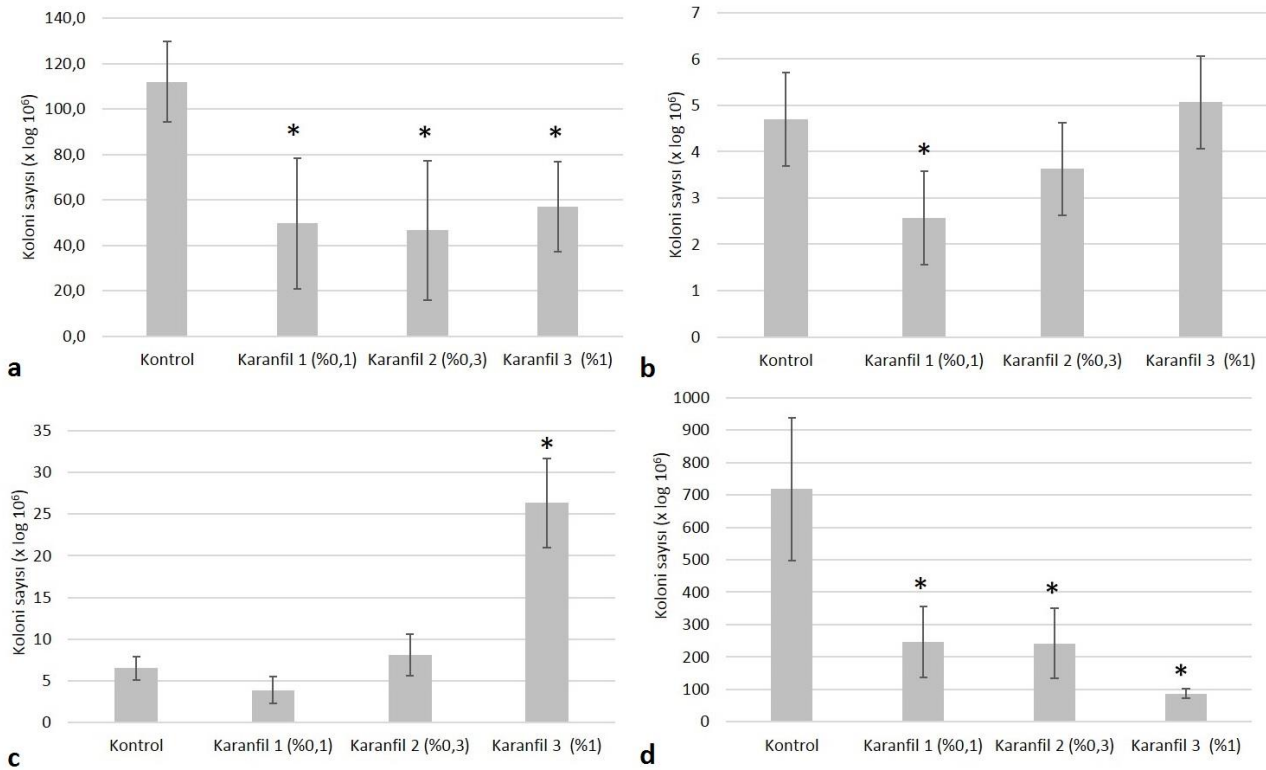
Diğer yandan, artan karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak bu bakterinin de sayısı azalmıştır. Deneysel probiyotik yoğurt gruplarının ortalama % yağ, % yağsız kuru madde, % protein, % laktik asit miktarları ile pH değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Üretilen yoğurtların kimyasal analiz sonuçlarında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Kontrol grubunun yağ miktarları, %0.3 ve %1 karanfil katkılı yoğurtlar ile aynı değeri gösterirken %0.1 karanfil katkılı yoğurtların yağ miktarı daha düşük bulunmuştur. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubunun yağsız kuru madde miktarı, karanfil gruplarına göre anlamlı düşük çıkmıştır.

Diğer yandan, yağsız kuru madde miktarı, artan karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. Tüm deneysel yoğurt gruplarının protein miktarları aynı olup herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Kontrol grubunun titrasyon asitliği karanfil gruplarına göre düşük bulunmuştur. Genel olarak titrasyon asitliği değerleri, artan karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak yükselmiştir. Kontrol grubunun pH değeri karanfil gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Artan karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak yoğurtların pH değerleri de düşmüştür (sırasıyla 3.91  $\pm$  0.06; 3.89  $\pm$  0.05 ve 3.88  $\pm$  0.01). Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Duyusal analizler sonucunda kontrol grubu toplamda en yüksek puanı (160 puan) almıştır. Karanfil 1 ve karanfil 2 gruplarının puanları aynı bulunup (153 puan) kontrol grubuna yakındır. Ancak, karanfil 2 grubu yoğurtları için panelistler koku ve tat özelliklerini daha yüksek puanlandırmışlardır.



**Şekil 1.** Çalışmada kullanılan karanfilin GC-MS kromatogramı  
**Figure 1.** GC-MS chromatogram of cloves used in the study



**Şekil 2.** Deneysel probiyotik yoğurt gruplarında bakterilerin miktarları a) *Sc. thermophilus*, b) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, c) *B. animalis* ssp. *lactis* ve d) *L. acidophilus*. \* Kontrol grubu ile karanfil grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

**Figure 2.** Bacterial numbers in experimental probiotic yogurt groups a) *Sc. thermophilus*, b) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, c) *B. animalis* ssp. *lactis* ve d) *L. acidophilus*. \* Differences between control group and clove's groups statistically significant (P<0.05)

**Tablo 1.** Probiyotik yoğurt gruplarının yağ, yağsız kuru madde ve protein oranları ile pH değerleri ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. SD: Standart sapma

**Table 1.** Fat, fat-free matter, protein percentages and pH values of probiotic yogurt groups are determined as mean  $\pm$  SD. SD: Standard deviation

	Kontrol (%0 karanfil)	Karanfil 1 (%0.1 karanfil)	Karanfil 2 (% 0.3 karanfil)	Karanfil 3 (%1 karanfil)
Yağ Miktarı (m/v %)	3.30 $\pm$ 0.00	3.20 $\pm$ 0.05	3.30 $\pm$ 0.06	3.30 $\pm$ 0.05
Yağsız Kuru Madde Miktarı (m/m %)	8.15 $\pm$ 0.01	8.22 $\pm$ 0.02	8.34 $\pm$ 0.02	8.62 $\pm$ 0.02
Protein Miktarı (m/m)	3.54 $\pm$ 0.02	3.54 $\pm$ 0.02	3.54 $\pm$ 0.01	3.54 $\pm$ 0.02
Titrasyon Asitliği (m/m %)	0.99 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.01
pH	3.98 $\pm$ 0.08	3.91 $\pm$ 0.06	3.89 $\pm$ 0.05	3.88 $\pm$ 0.01

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Probiyotik besinlerde, probiyotik mikroorganizmaların sayısı önerilen  $1.0 \times 10^6$  kob/g değerini aşmalıdır (Samona ve Robinson 1994). Böylece, probiyotik ürün potansiyel olarak optimal terapötik etkilere ulaşabilir. Yapılan bir çalışmada,  $10^{10}$  kob/g miktarında *Lactobacillus casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen mesane kanserine yakalanmış bireylerde tedavi sürecinin hızlandığı tespit edilmiştir (Aso ve Akazan 1992). Diğer yandan, probiyotiklerle yapılan *in vitro*, *in vivo* ve insan çalışmalarında probiyotiklerin aynı zamanda birçok kanser türünün oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Yu ve Li 2016). Çalışmamızda, probiyotik bakterilerin tüm deneysel gruplarda  $1.0 \times 10^6$  kob/g değerini aştığı bulunmuştur. Ancak, kullanılan starterlerdeki bakterilerin sayısının tespiti yapılmamıştır. Genel olarak karanfil baharatının antibakteriyel etkiye sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Burt 2004). Ancak, araştırmalar hep hayvan ve insan patojen bakterileri ile ilgilidir. Bu çalışma ile ilk defa olarak karanfilin yoğurt ve probiyotik yoğurt starter kültürleri üzerine etkisi ortaya konmuştur. Yüksek konsantrasyonda karanfil (%1) katılan probiyotik yoğurtlarda *B. animalis* ssp. *lactis* sayısı artmışken *L. acidophilus* sayısı azalmıştır. Yine aynı deneysel grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yoğurt bakterilerinden *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısı artarken *Sc. thermophilus* sayısı azalmıştır. Diğer yandan, yüksek konsantrasyonda karanfil katılmış probiyotik yoğurtların duyu analizi sonucu, diğer deneysel yoğurt gruplarına göre puan olarak düşüktür. Kontrol yoğurtlarında *Sc. thermophilus* sayısı anlamlı yüksek olup duyu kalitesi de karanfil katılı probiyotik yoğurtlara nazaran yüksek bulunmuştur. Daha önce yapılmış bir çalışmanın sonuçları da bu sonuçları desteklemektedir ve bu çalışmada *Sc. thermophilus* sayısı ile yoğurtların duyu kalitesi arasında pozitif korelasyon bulunduğu rapor edilmiştir (Çakmakçı ve ark. 2012).

Buna karşılık, aynı çalışmada yüksek miktarda *B. bifidum* sayısının yoğurdun kabul edilebilirliğini artırdığı belirtilmiş olup bizim çalışmamızda ise bunun aksine *B. animalis* ssp. *lactis* sayısının yüksek olmasının yoğurdun duyu kalitesine olumlu etkisi görülmemiştir. Diğer yandan, üretilen karanfil katılı probiyotik yoğurtlarda karanfilin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus acidophilus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, karanfilin esansiyel yağlarının veya başlıca bileşenlerinin bazı patojen mikroorganizmaların (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

*typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) hücre zarını parçalaması nedeniyle ilişkilendirilebilir (Cui ve ark., 2018; Devi ve ark., 2010; Rhayour ve ark., 2003; Xu ve ark., 2016). Çalışmada kullanılan toz haline getirilmiş karanfilin GC-MS analizi sonucu içinde en yüksek oranda bulunan Eugenol (%62.152) olup sonuç önceki araştırmalarla uyumlu bulunmuştur (Chaieb ve ark., 2007).

Yoğurt ülkemizde yaygın olarak tüketilen bir fermente besin olup kuru madde ve kalsiyum miktarı yüksek ve protein kalitesi iyidir. Deneysel probiyotik yoğurt gruplarının yapımında kullanılan sütteki yağ oranı %3 olup, yoğurt üretilirken buharlaşma nedeniyle toplam kuru maddesinin artmasıyla paralel olarak yoğurtların yağ miktarlarında da artış olmuştur. Grupların ortalama yağ oranı %3.2  $\pm$  0.1 olarak bulunmuştur. Karanfil 3 grubunda karanfil konsantrasyonunun diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen yoğurttaki yağ miktarının bundan etkilenmediği görülmüştür. Fenderya ve Akalın'ın (2003) çalışmasında, süt tozu katarak ürettikleri probiyotik yoğurtların ortalama yağ oranları %3.99  $\pm$  0.27 olarak bulunmuştur. Bu iki çalışma göz önüne alındığında, yoğurdun ham maddesi olan sütün yağ oranı doğrudan, üretilen probiyotik yoğurtların yağ oranını etkilemiştir. Çalışmamızda; karanfil gruplarının yağsız kuru madde miktarları, karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol grubuna göre artış göstermiş ve tüm grupların ortalaması %8.33  $\pm$  0.2 olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, probiyotik katkı üretilen probiyotik yoğurtların kuru madde içerikleri %9.8-12.0 arasında bulunmuştur (Yeşilçubuk ve ark. 2014). Diğer bir araştırmada ise probiyotik yoğurtların toplam kuru madde miktarları ortalama %11.21 bulunmuştur (Fenderya ve Akalın 2003). Adı geçen çalışmalarda, yoğurtların yağsız kuru madde oranının çalışmamıza göre yüksek olması, diğer çalışmalarda probiyotik ve süt tozu katılmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızda tüm grupların protein oranları aynı bulunmuştur (%3.54). Bu durum, karanfildeki protein oranının çok düşük olmasına (%3) bağlanabilir (SELF Nutrition data 2018). Diğer yandan, bir probiyotik yoğurt çalışmasında, elma lifi ilavesiz kontrol grubunda protein oranı %3.87  $\pm$  0.15 iken %1 elma lifi ilave edilmiş yoğurtta %3.86  $\pm$  0.21 bulunmuştur (Akın ve Akın 2016). Titrasyon asitliği karanfil gruplarında kontrol grubuna göre yüksek çıkmış ve karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak artış görülmüştür (%1.03  $\pm$  0.05; % 1.07  $\pm$  0.02; %1.08  $\pm$  0.01). Yeşilçubuk ve ark. (2014)'nın yaptığı bir çalışmada, probiyotik yoğurtlarda titrasyon asitliği %0.8-1.0 arasında saptanmıştır. Diğer bir çalışmada, probiyotik yoğurtlarda titrasyon asitliği %1.02  $\pm$  0.02

olarak belirtilmiştir (Fenderya ve Akalın 2003). Kontrol grubunun pH değeri ( $3.98 \pm 0.08$ ), karanfil gruplarına göre yüksek çıkmışken, karanfil gruplarında pH değeri karanfil konsantrasyonuna bağlı olarak düşük bulunmuştur. Probiyotik yoğurttan çam balının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise; bal ilavesiz kontrol grubu yoğurtlarda ölçülen pH değeri, %2, %4 ve %6 çam balı ilave edilmiş yoğurtlara göre daha yüksek çıkmıştır (Dirican-Karabulut 2017). Çalışmamızda, asitlik değeri birbirine yakın olan kontrol ile karanfil 1 ve 2 gruplarının duyuşal analiz sonuçları da, toplam kabul edilebilirlik puanlamasında birbirine yakın bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, muz katkılı probiyotik yoğurtların asitliği ile duyuşal değerlendirilmesinde kabul edilebilirlik arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çakmakçı ve ark. 2012).

Sonuç olarak; probiyotik yoğurda katılan karanfilin, ürünün mikrobiyal ve kimyasal kalitesini artırdığı diğer yandan duyuşal özellikleri üzerinde ise de önemli düzeyde bir olumlu etkisinin olmadığı görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi Koordinasyonu tarafından destek almıştır (Proje no: 1.2017/13). Ayrıca çalışmamız 28-29 Haziran 2019 tarihlerinde 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Ankara, Türkiye) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuş ve özeti kongre kitapçığında basılmıştır (sayfa no: 629).

## KAYNAKLAR

- Akın MS, Akın MB (2016). Elma lifi ile zenginleştirmenin set tipi yoğurtların bazı özelliklerine etkisi. *Harran Tar Gıda Bil Derg*, 20, 94-104.
- Aso Y, Akazan H (1992). Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Intl*, 49, 125-129.
- Begum PS, Madhavi G, Rajagopal S, Viswanath B, Razak MA, Venkataratnam V (2017). Probiotics as functional foods: potential effects on human health and its impact on neurological diseases. *Intl J Nutr Pharmacol Neuro Dis*, 7, 23.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Intl J Food Microbiol*, 94, 223-253.
- Cava R, Nowak E, Taboada A, Marin-Iniesta F (2007). Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J Food Protect*, 70, 2757-2763.
- Cemeroğlu BS (2013). Gıda Analizleri. Bizim Grup Basımevi, Ankara.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Res*, 21(6), 501-506.
- Cui H, Zhang C, Li C, Lin L (2018). Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 94, 140-146.
- Çakmakçı S, Çetin B, Turgut T, Gürses M, Erdoğan A (2012). Probiotic properties, sensory qualities, and storage stability of probiotic banana yogurts. *Turk J Vet Anim Sci*, 36, 231-237.
- Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol*, 130(1), 107-115.
- Dirican-Karabulut L (2017). Probiyotik Yoğurdun Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri Üzerine Çam Balının Etkisi. Tez (Yüksek Lisans). Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Fenderya S, Akalın AS (2003). Probiyotik yoğurtların bazı kimyasal özellikleri üzerine bir araştırma. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg*, 2003, 40, 87-94.
- Granato D, Nunes DS, Barba FJ (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends Food Sci Technol*, 62, 13-27.
- Hammad AM (2016). Antimicrobial effect of cinnamon and clove on *Staphylococcus aureus* in milk and yogurt. *AJVS*, 48, 1-6.
- International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2006). Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37 °C. International Standard ISO 0128:2006(E) / IDF 192:2006(E). ISO, Geneva, Switzerland / IDF, Brussels, Belgium, 11 pp.
- International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2010). Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria – Colony count technique at 37 °C. International Standard ISO 29981:2010(E)/IDF 220:2010(E). ISO, Geneva, Switzerland / IDF, Brussels, Belgium, 17 pp.
- Kıyık SN, Dağlı Y, Zeren Ü, Arıburnu M, Gülbandır A, Dönmez M, Okur M. (2014). A functional food: "Şifalı Top". *Turk J Agricult-Food Sci Technol*, 2, 277-279.
- Kopp-Hoolihan L (2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc*, 101, 229-241.
- Lourens-Hattingh A, Viljoen BC (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *Intl Dairy J*, 11, 1-17.
- Milind P, Deepa K (2011). Clove: a champion spice. *Intl J Res Ayurveda Pharm*, 2, 47-54.
- Mishra RK, Singh SK (2013). Reproductive effects of lipid soluble components of *Syzygium aromaticum* flower bud in male mice. *J Ayurveda Integr Med*, 4, 94.
- Mytle N, Anderson GL, Doyle MP, Smith MA (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*, 17, 102-107.
- Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazil J Microbiol*, 31, 247-256.
- Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Essential Oil Res*, 15(5), 356-362.
- Roberfroid MB (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*, 71, 1682-1687.
- Samona A, Robinson RK (1994). Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *J Soc Dairy Tech*, 47, 58-60.
- Sanches B, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M (2009). Probiotics fermented milks: present and future. *Intl J Dairy Technol*, 62: 472-483.
- SELF Nutrition Data. Spices, cloves, ground Nutrition facts & calories <http://nutritiondata.self.com/facts/spices-and-herbs/181/2>, Erişim tarihi: 12 Şubat 2018.
- Süle J, Körösi T, Hucker A, Varga L (2014). Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Brazil J Microbiol*, 45, 1023-1030.
- Tekinşen OC, Atasever M, Keleş A, Tekinşen KK (2002). Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim ve Kontrol. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği/ Ek-15: Sağlık Beyanları ve Beyan Koşulları
- Türk Standartları: İnek sütü – Çiğ Standardı. TS 1018/Nisan 2002
- Türk Standartları: Yoğurt Standardı. TS 1330/ Nisan 2006
- Yeşilçubuk Ş, Ünver N, Hazal İ (2014). *Saccharomyces boulardii* Kullanarak Probiyotik Yoğurt Üretimi ve Bazı Probiyotiklerin Yoğurtların Çeşitli Nitelikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Tez (Yüksek Lisans). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yu AQ, Li L (2016). The potential role of probiotics in cancer prevention and treatment. *Nutr Cancer*, 68, 535-544.
- Xu, J. G., Liu, T., Hu, Q. P., & Cao, X. M. (2016). Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1194.



## Fractures and Treatment Methods in Wild Avians

Caner KAYIKCI<sup>1</sup> Yağmur KUŞCU<sup>1</sup> Atilla DURMUŞ<sup>2</sup> Loğman ASLAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary, Department of Surgery, Van, Turkey

<sup>2</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Science, Department of Zoology, Van, Turkey

<sup>3</sup> Van Yuzuncu Yil University, Wild Animals Protection and Rehabilitation Center, Van, Turkey

Received: 26.04.2019

Accepted: 25.07.2019

### ABSTRACT

Predatory avians are indispensable and important elements in the continuity of natural balance. The richness of Turkey in various natural resources, its geographical location due to the migration routes, the abundance of water, habitat and the favourable climatic conditions facilitate the life of these animals. Fractures are an important problem in wild avians as well as in pets. Wing and extremity fractures are the most common problems observed in avians. The study material is the fractured extremity cases of 75 predatory wild avians. All 75 cases included in the study were selected from closed extremity fractures. Our treatment protocol involved cage rest, external coaptation and internal fixation. It has been considered that emergency intervention, external coaptation, an adequate time of hospitalization increase the success rate of operative intervention.

**Keywords:** Animals, Fracture Fixation, Raptors, Wild

### öz

### Vahşi Kuşlarda Kırıklar ve Tedavi Yöntemleri

Yırtıcı kuşlar doğal dengenin devamlılığında vazgeçilmez önemli unsurdurlar. Ülkemizin çeşitli doğal kaynaklarındaki zenginliği, coğrafik konumu, göç güzergâhı üzerinde bulunması, su ve habitat bolluğu ve uygun iklim koşulları bu hayvanların yaşamını kolaylaştırmaktadır. Kırıklar, evcil hayvanlarda olduğu gibi yabani kuşlarda da önemli bir sorundur. Kanat ve ekstremitte kırıkları kuşlarda gözlenen en yaygın problemlerdendir. Çalışma materyalini 75 adet yırtıcı kanatlı yaban hayvanında ekstremitte kırıkları oluşturmaktadır. Çalışmaya dâhil edilen 75 adet vakanın tamamı kapalı ekstremitte kırıklardan seçilmiştir. Tedavi protokolümüzü kafes istirahati, eksternal koaptasyon ve internal fiksasyon oluşturmuştur. Genel durumu stabil hale getirme esnasında yapılan işlemler, acil müdahale, operasyon sonrası bölgenin lokalizasyonuna göre uygun bir eksternal koaptasyon ve yeterli sürede hospitalizasyon ile operatif müdahalenin başarı oranını arttırdığı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Vahşi hayvanlar, Yırtıcı Kuşlar, Kırık sabitlemesi

### INTRODUCTION

Predatory avians are indispensable and important elements in the continuity of natural balance. Avians, like every living creature, provide significant contributions to nature. The depletion of such species of animals will lead to the destruction of the balance of the nature (Kibar and Bumin 2006). The richness of Turkey in various natural resources, its geographical location, its location on the migration route, the abundance of water, habitat and the favourable climatic conditions facilitate the life of these animals. Despite 437 species of avians have been identified in Turkey, it is thought that the figure is over 500.

The lake Van basin has an undamaged nature and 1/5 (418,560 hectares) of wetlands in Turkey. Recent research shows that the number of avians living in the lake Van

basin have increased up to 213, and as ornithological investigations become widespread, it is thought that this number can reach up to 300 (Aslan et al. 2009; Ünsaldı and Ünsaldı 2012). Fractures are an important problem in wild avians as well as in pets. Wing and extremity fractures are the most common problems observed in avians (Muller and Nafeez 2015).

In avians, the risk of fracture formation can be occurred as a result of injury or shotgun fire. Fractures created by firearms can be in any of the bones, and they are more serious for the animals because they also damage the soft tissues (Harold 1941). Wing fractures can be occurred during flaying and they usually happen as a result of collisions. For example, it can occur during migration or colliding with other objects such as trees, walls, windows, and automobiles (Harold 1941, Scheelings 2014, Aslan et



al. 2018). Fractures in the legs can be caused by traps prepared for the animal, or by the avians' jamming their legs in between the wire of their cage. In young avians, fractures can also occur as a result of falling from their nest (Harold 1941; Westfall and Egger 1979).

In the healing of fractures, endosteal and periosteal callus play a role together. However, endosteal callus contributes more to the healing of pneumatic bone fractures (Ünsaldı and Ünsaldı 2012). In primary fracture healing, there is a direct healing in the bone without any callus formation, through havers system. In the occasions of achieving perfect reduction and rigid fixation, callus formation is minimal (Doneley 2016). In avians, a large part of the callus is formed in the intramedullary canal (Bush 1977). Endosteal callus formation is the most important stage of fracture healing. This formation is occurred rapidly in the exposed bones and provides a rigid support (Bush 1977; Doneley 2016). In cases where appropriate stability of the fractured tips cannot be achieved, periosteal callus formation is observed (Doneley 2016). Fractures, in which rigid fixation is achieved, heal within 3 weeks. In avians, the diameters of the bones in relation to the air sacs are quite wide (Bush 1977; Bennett and Kuzma 1992). Avian bones are fragile due to their fine structure and high calcium content (Bush 1977; Bennett and Kuzma 1992; Goody et al. 2012). Many bones in the distal extremity are covered only with tendons and skin (Bennett and Kuzma 1992). Fractures are usually open (62%) and fragmented, due to the thin and fragile nature of the bones and the small amount of soft tissue support. These factors often cause damage to the fragments and regional vascularization (Mathews et al. 1994; Doneley 2016).

Radiology is a useful method for monitoring the healing process of fractures. Radiographs are taken at the 2nd, 4th, 6th, and 8th weeks on post-operative period day 0 to evaluate radiographic integrity, synostosis and remodelling of the callus formation. Since the fracture management in avians is an important clinical problem, successful fracture treatment requires accurate diagnosis and effective management (Tunio et al. 2014). Methods such as cage rest, external coaptation, internal and external fixation, plate and cerclage wire are used widely and routinely in avian extremity fractures (Ünsaldı and Ünsaldı 2012; Muller and Nafeez 2015). Small-sized avians can heal with cage rest, without the need for any fixation, in the treatment of non-load bearing bone fractures such as the shoulder girdle (coracoid, clavicle and scapula) and pelvis fractures. Furthermore, in dislocated fractures, or at minimal separation, a good recovery can be achieved by restricting the movement of avians by cage rest and appropriate analgesia (Helmer and Redig 2006; Jones 2013). External coaptation is an inexpensive, easy and effective method for the immobilization of some fractures. Since the application is usually rapid, short-term anaesthesia is sufficient. Splint applications, figure-of-8 bandage, and sandwich bandage applications are common methods of coaptation. Sandwich bandages are particularly beneficial in tibiotarsus/tarsometatarsus or phalangeal fractures of small-sized avians. The figure-of-8 bandage can be completely wrapped around the body, as well as covering only the relevant extremity (Helmer and Redig 2006; Jones 2013).

#### **Wing Bones (Humerus, Ulna, Radius, Metacarpal)**

The humerus is a long bone in the pneumatic structure and is connected to the clavicular air sacs. Fractures can be repaired with single or multiple intramedullary pins. The

natural curvature in the structure of the humerus allows the pins to exit proximal near the shoulder region or close to the elbow at the distal, without involving the joints (Forbes 1998). In ulna-radius bones, 30% of fractures occur only in ulna, only 10% in radius and 60% in both. In avians with ulna or radius fractures, cage rest is sufficient alone (supported or unsupported) when displacement is in negligible levels. When internal fixation is needed, usually the intramedullary pin alone is sufficient. If the fracture occurs in both bones, the pin is often placed only in the ulna (Forbes 1998). Metacarpal bones are weak in terms of soft tissue that protects and provides blood support. It is more likely to have open fractures after trauma. For all these reasons, the success rate of fixation is lower than other bones. As the reduction can be achieved easily, the sandwich bandage is suitable for closed stabilization (Dar et al. 2015).

#### **Pelvic extremity (Femur, Tibiotarsus)**

The femur is a pneumatic bone. The number of intramedullary pins to be applied varies according to the localization of the fracture. Tibiotarsus bone fractures are the most common fractures. Since the medullary cavity narrows at the distal end of the cavity, intramedullary pin application with cerclage will be sufficient to its treatment (Forbes 1998). Steinman pin is the most commonly used pin type in internal fixation and is widely used in the treatment of tibiotarsal fractures (Jones 2013).

In this study, it was aimed to evaluate the first interventions, fixation methods, external coaptation methods, postoperative care and the rates of release and rehabilitation of the avians.

## **MATERIALS and METHODS**

The study material is the fractured extremity cases of 75 predatory wild avians brought to Van Yuzuncu Yil University Wild Animals Protection and Rehabilitation Directorate. All 75 cases included in the study were selected from closed extremity fractures (Table 1).

**Table 1.** Animal species

<b>Species</b>	<b>Number</b>
Owl	15
Eagle	19
Falcon	14
Vulture	10
Hawk	17

Our treatment protocol involved cage rest, external coaptation and internal fixation (Table 2). The predatory avians brought to the clinic were recorded, and the anamnesis information was taken as far as possible. The animals were first subjected to the general examination, in order not to cause further trauma, and to determine whether there were any other problems that could lead to life-threatening injuries. For shock therapy, dexamethasone at 0.5 mg/kg and balanced fluid electrolyte at 50-85 mL/kg doses were administered. Until the animal's medical condition was stabilized, temporary support was applied to the fracture site and the animal was hospitalized in a warm, dim and quiet environment. Prior to fracture evaluation and treatment, all avians were awaited to become medically stable. Extremities of

stabilized predatory avians were evaluated for neurological disorders, fractures, and dislocations.

**Table 2.** Treatment methods

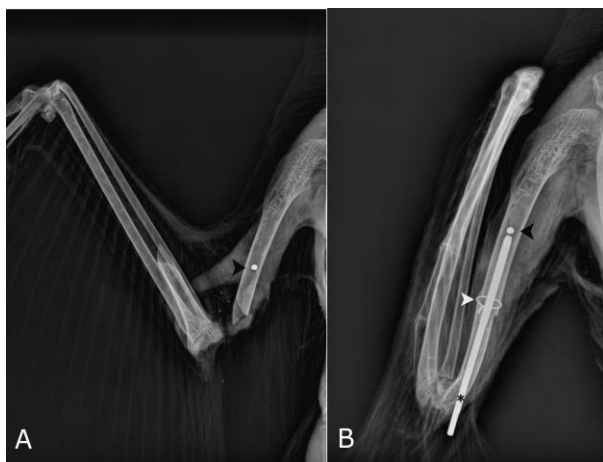
Treatment Methods	Numbers
Cage Rest	20
External coaptation	32
Internal fixation + external coaptation	23

As a result of the radiological examination, the treatment method to apply was determined through the evaluation of the fracture. The feeding of the avians was ceased 6 hours prior to the operation. All avians were anesthetized with isoflurane. The induction was done with a gas mask, with a mixture of 5% isoflurane and O<sub>2</sub> (1-1.5 L/min). Immediately after the induction, endotracheal intubation was performed. An endotracheal tube (2.5-4 mm in diameter) without cuff was used for intubation. Anaesthesia was maintained with a mixture of 1.5-2.5% isoflurane and O<sub>2</sub> (1-1.5 L/min). During the operation, heater pads were used to prevent hypothermia.

Figure-of-8 bandages and sandwich bandages were applied in non-dislocated wing fractures (Fig 1). For the dislocated fractures, after the reduction using Steinman pins and cerclage wire, external coaptation was applied (Fig 2). Splint and sandwich bandage applications were performed in non-dislocated fractures of the pelvic extremity (Fig 3). Splint and sandwich bandage treatments were performed after reduction of the dislocated fractures of the pelvic extremity with Steinman and cerclage wire.



**Figure 1 (A-B).** Figure-of-8 bandage in eagle



**Figure 2 (A-B).** A. Distal fracture of humerus due to the firearm injury. Black arrow: shotgun pellet. B. Postoperative radiographic image. White arrow: cerclage wire practice. Asterisk (\*): Intramedullary pin



**Figure 3.** A. Radiographic image of the tibial fracture. B. Radiographic image after external coaptation

In the cases, for which the operation was decided, the feathers were completely torn off to 2-3 cm away from the area to be operated, and the region was prepared with 10% Povidone solution. During the operation, 10 ml of 0.9% NaCl and 5% dextrose were administered intravenously following subcutaneous administration of the 20 ml/kg lactated ringer solution. In the humerus fractures, the corresponding wing was placed in the lateral position to remain on top. The pin, which was removed from the proximal fragment by using the retrograde method, was advanced onto distal epiphysis following reduction. The operated wing was allowed to immobilize using the figure-of-8 bandage, after giving a mid-level flexion position.

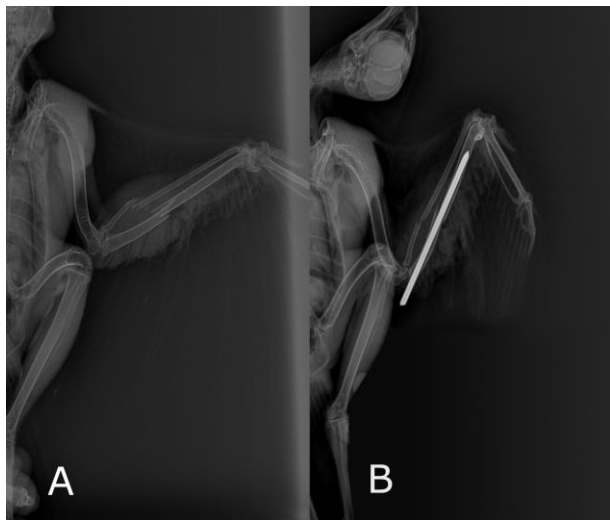
In radius-ulna fractures, the animal was placed on the table in the sternal position. The wing was opened, and the dorsal approach was used to reach the ulna bone. Two cm longitudinal incision on the skin was made in order to easily approach between the radius and the ulna in the craniodorsal direction. Musculus extensor metacarpi ulnaris, musculus extensor metacarpi radialis, musculus extensor digitorum communis and fascia were retracted, so that ulna was exposed. After intramedullary pin application in ulna fractures, immobilization was achieved by wrapping the wing with the figure-of-8 bandage (Fig 4).

**Table 3.** Fracture localizations and numbers

Bones	Number
Humerus	7
Antebrachium	34
Metacarpus	9
Femur	6
Tibiotarsi	20
Tarsometatarsi/ Phalanges	13

In tibiotarsal fractures, the animal was placed on the table in the lateral position, with the corresponding extremity

underneath. A medial approach was performed to reach the tibiotarsal bone. An incision of 4 cm in length was performed on the skin. To reach the fractured bone ends, the muscle layers were carefully separated. The intramedullary pin was directed, first in a retrograde way and then to the proximal fragment with a drill at slow speed (<150 rpm). After the fracture tip was appropriately reduced, the pin was advanced to the end of the medullary canal of the distal tibiotarsus (Table3).



**Figure 4 (A-B).** A. Fracture in radius-ulna bone. B. Intramedullary pin practice in ulna

The muscle layer was sutured with 4/0 polyglycolic acid material and skin was sutured with 2/0 polyglycolic acid material and simple interrupted suture technique was used.

#### Post-operative care

Immediately after the operation, the nonsteroidal anti-inflammatory-analgesic effective butorphanol tartrate was administered subcutaneously at a dose of 0.2 mg/kg for the control of pain. Against infections, the enrofloxacin injection solution was administered intramuscularly at a dose of 10 mg/kg twice daily for 7 days. The operation area was closed with a sterile wound pad. The applied figure-of-8 bandage and skin sutures were removed on the 12<sup>th</sup> day of the operation. Clinical findings of healing began to be observed in the third week. The pins were removed on the 28<sup>th</sup> day.

#### RESULTS

Clinical and radiographic examination revealed that 15% of the cases were gunshot injuries and 85% of the cases were of other traumatic causes. Of the fractures in the limbs, 52% occurred in the wings, 40% in the pelvic limb, and 8% fractures were in the other than limbs.

28% of the fractures in the wings were observed in the humerus, 50% in the radius-ulna and 22% in the metacarpal bones. Of the radius-ulna fractures, 56% were found to be on both of the bones, 28% on the ulna and 16% on the radius bone.

It was determined that 24% of the fractures in the pelvic extremity were found in the femur, 51% in the tibiotarsal bones and 25% in the metatarsal bones.

Clinical improvement was observed in 45 of 75 cases. Of the clinically healed animals, 18 showed functional improvement until they were left to nature again. 27

avians that cannot be released to the environment were included in the rehabilitation program in the centre.

#### DISCUSSION and CONCLUSION

Fracture is a common clinical problem in avians, and a successful fixation for a proper treatment is needed. Because of the unique anatomic structure of the avians' bones, options for fracture treatment are limited (Ahmed et al. 2013). In avians, fractures of the wing bones that occur due to firearm injuries and as a result of impacts on tree branches, electric wires or other obstacles are common (Aslan et al. 2009; Venugopal et al. 2014).

Due to the thin and fragile structure of the avians' bone cortex, pin or screw holding power is weak and they are reported to cause iatrogenic fractures (Degernes et al. 1998; Goody et al. 2012). In our study, iatrogenic fractures were rarely formed, especially when open reductions were attempted. Another problem with avian orthopaedics is that the size of the animal is small and the soft tissues in the distal extremities are weak (Degernes et al. 1998). In our study, fractures in the distal extremities were observed to heal later than in fractures in other areas that are rich in soft tissues.

Clinically, fractures in avians recover faster than those of in mammals (Bennett and Kuzma 1992; Dar et al. 2015). Well-aligned stable fractures show clinical improvement within 3 weeks (Bennett and Kuzma 1992; Venugopal et al. 2014). Generally, implants can be safely removed because radiographic evidence of callus formation is not detected and adequate stabilization is achieved (Bennett and Kuzma 1992). In our study, the removal time of the implants was determined to be 28 days on average.

In fracture treatment, cage rest is an inexpensive and easily applicable method. Since the affected knee joints are not restricted, the likelihood of ankyloses is low. However, in moving avians, un-stabilized fracture fragments cause the animal to become self-destructive, causing more tissue damage to the animal. However, in cage rest, excessive callus and slow recovery are the issues. As a result of defective bone union and overriding, extremity shortening may occur (Bennett and Kuzma 1992). In our study, it was observed that the clinical healing was slower than the other treatment methods at 20 avians treated with cage rest. In the treatment, 4 of the avians subjected to cage rest were released to the nature due to functional recovery.

In our study, figure-of-8 bandage and sandwich bandage applications among the external coaptation types were widely used. In the distal wing fractures, the desired clinical healing was achieved with sandwich bandage applications. Six of the animals treated with this treatment protocol were released back to nature, showing functional improvement.

Intramedullary pin application is also widely used in the treatment of avian fractures. Its application is easy and relatively cheap. However, this treatment cannot prevent rotational forces. Moreover, since the medullary channels of pneumatic bones are wide, a single pin is usually not sufficient (Muller and Nafeez 2015). In humerus diaphyseal midline fractures, the figure-of-8 bandage may not be sufficient for stabilization alone. External coaptation, which is applied to prevent rotations after internal fixation in metacarpal and pelvic extremity

fractures, also accelerates healing. With adequate stabilization and immobilization, clinical stability can be achieved in 3 weeks in avian fractures (Orosz 2002; Goody et al. 2012; Venugopal et al. 2014; Dar et al. 2015). In our study, intramedullary pin and external coaptation were used in the treatment protocol, 8 avians were returned to the nature with functional recovery. In our study, the most favourable results in terms of recovery time were obtained in this protocol.

In our study, it was determined that fractures observed in wing bones due to trauma were observed more frequently than in other bones in predatory avians. It has been considered that stabilizing the general situation, emergency intervention, an adequate external coaptation following the operation depending on the localization of the fracture, and an adequate time of hospitalization increase the success rate of operative intervention.

## REFERENCES

- Ahmed T, Jalila A, Intan-Shameha A, Meng G, Shanthi G (2013).** Histological evaluation of transverse fracture healing in pigeon (*Columba livia*) ulna. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.*, 3(10), 380-386.
- Aslan L, Adizel Ö, Karasu A, Özkan C, Gençcelep M, Durmuş A, Akgül Y (2009).** Van gölü havzasında 2006-2008 yılları arasında yabani kuşlarda yaralanma ve kırık olgularının tedavileri. *Van Vet J*, 20(2), 7-12.
- Aslan L, Adizel Ö, Sancak T (2018).** Treatment and rehabilitation of wild birds and mammals. *Indian J Anim Res*, 52(4), 623-627.
- Bennett RA, Kuzma AB (1992).** Fracture management in birds. *J Zoo Wildlife Med*, 23(1), 5-38.
- Bush RM (1977).** External fixation of avian fractures. *J Am Vet Med Assoc*, 171, 943-946.
- Dar K, Mehraj-U-Din D, Sheikh A, Baba M, Dar S (2015).** Surgical management of compound metacarpal fracture in black kite (*Milvus migrans*): A case report. *Inter J Vet Sci*, 4(2), 101-103.
- Degernes LA, Roe SC, Abrams C (1998).** Holding power of different pin designs and pin insertion methods in avian cortical bone. *Vet Surg*, 27(4), 301-306.
- Doneley B (2016).** Avian medicine and surgery in practice: Companion and aviary birds. Taylor and Francis Group, Florida.
- Forbes N (1998).** Avian orthopedics. *Vet Quart*, 20(1), 69-70.
- Goody A, Head J, Gianopoulos A, Liu S, McCoy B (2012).** A novel approach to tibiotarsal fracture management in the hawaiian nene. *J Wildlife Rehab*, 32(1), 7-10.
- Harold BW (1941).** Fractures among birds. *Bird-Banding*, 12(2), 68-72.
- Helmer P, Redig PT (2006).** Surgical resolutions of orthopedics disorders In: *Clinical Avian Medicine*, Harrison G, Lightfoot T (Ed), 761-774, Florida.
- Jones R (2013).** Fracture management in birds, <https://www.vettimes.co.uk/article/fracture-management-in-birds/?format=pdf>, Accessed: 15 January 2019.
- Kibar M, Bumin A (2006).** Yırtıcı kuşlarda ateşli silah yaralanması sonucu oluşan kırıkların değerlendirilmesi. 85 olgu (1998-2005). *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12(1), 11-16.
- Mathews KG, Wallace LJ, Redig PT, Bechtold JE, Pool RR, King VL (1994).** Avian fracture healing following stabilization with intramedullary polyglycolic acid rods and cyanoacrylate adhesive vs. Polypropylene rods and polymethylmethacrylate. *VCOT*, 7, 158-169.
- Muller MG, Nafeez JM (2015).** A new approach for tibiotarsal fractures in falcons with the fixex tubulaire type fessa system, Available at: <https://www.falconhospital.com/media/1461/fractures-tibiotarsus-in-falcons-fessa.pdf>, Accessed 14.07.2018.
- Orosz SE (2002).** Clinical considerations of the thoracic limb. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 5(1), 31-48.
- Scheelings TF (2014).** Coracoid fractures in wild birds: A comparison of surgical repair versus conservative treatment. *J Avian Med Surg*, 28(4), 304-308.
- Tunio A, Jalila A, Meng CY, Shameha I (2014).** Experimental fracture healing with external skeletal fixation in a pigeon ulna model. *J Adv Vet Anim Res*, 1(2), 58-64.
- Ünsaldı S, Ünsaldı E (2012).** Bir tavşancıl (*Hieraaetus fasciatus*)'ın parçalı sağ ulna kırığının kemik manşonla sağaltımı. *Van Vet J*, 23(1), 55-59.
- Venugopal SK, Anoop S, Sherin BS, Philip SB, Prakash S, Bini J, Ashay PK (2014).** Repair and management of fractured wing in an indian peafowl (*Pavo cristatus*). *MJV*, 5(1), 15-19.
- Westfall ML, Egger EL (1979).** The management of long bone fractures in birds. *Iowa State University Veterinarian*, 41(2), 81-87.







## Investigation of the Antidiabetic Effects of Mistletoe (*Viscum album L.*) Extract in Experimental Diabetes in Rats

Avin Kawa AHMED\* Handan MERT Nihat MERT

Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

Received: 14.06.2019

Accepted: 19.07.2019

### ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder of multiple etiologies distinguished by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism. Extracts of the *V. album* leaves was reported to exert a beneficial effect to alleviate the symptoms of diabetes in local medicines. The aim of present investigation is to evaluate the antidiabetic and antioxidant activities of *V. album* extracts on streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. Thirty two female Wistar albino rats, aging 6-7 weeks, were included in the present study. The rats were randomly divided into 4 groups: Group I (Control), Group II (*V. album*), Group III (Diabetic), Group IV (Diabetic + *V. album*). After experimental period, all animals were decapitated, blood was collected and sera were separated. Serum concentrations of total cholesterol, high density lipoprotein, cholesterol, triglyceride, folic acid, vitamin D, vitamin B<sub>12</sub> and glucose were determined by using automatic analyzer. Total Antioxidant Capacity (TAC) and Total Oxidative Status (TOS) analyses were measured ELISA. The levels of glucose ( $p \leq 0.05$ ), vitamin B<sub>12</sub> ( $p \leq 0.05$ ), TOS ( $p \leq 0.05$ ) were significantly decreased and TAC ( $p \leq 0.05$ ) increased in diabetic+*V. album* group compared to diabetic group. In conclusion extracts of *V. album* have antidiabetic effects that significantly decreased glucose level when treated with *V. album* only 20 days of experiment. *Viscum album* had a stronge antioxidant activity that can help to prevent the formation of diabetic complications.

**Keywords:** Diabetes, Lipoproteins, Total antioxidant capacity, Total oxidative status, *Viscum album*, Vitamins

### ÖZ

## Ratlarda Deneysel Diyabette Ökseotu (*Viscum album L.*) Ekstresinin Antidiyabetik Etkilerinin Araştırılması

Diyabet çoklu etiyolojisi, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ve kronik hiperglisemi ile seyreden metabolik bir hastalıktır. *V. album* (ökse otu) yaprak ekstreleri, diyabet semptomlarını hafifletmek, diyabete yararlı bir etki sağlamak için kullanılan yöresel bir bitkidir. Bu çalışmanın amacı, *V. album* ekstraktlarının streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabetik sıçanlar üzerindeki antidiyabetik ve antioksidan aktivitelerini araştırmaktır. Araştırmada 32 adet, dişi 6-7 haftalık Wistar sıçanları kullanıldı. Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup I (Kontrol), Grup II (*V. album*), Grup III (Diyabetik), Grup IV (Diyabetik + *V. album*). Deneme sonunda tüm gruplardaki sıçanların kan örnekleri alınıp hemen serumları ayrıldı. Total kolesterol, HDL, trigliserit, folik asit, vitamin D, vitamin B<sub>12</sub> ve glukoz düzeyleri otoanalizörde saptandı. TAC ve TOS analizleri ELISA'da ölçüldü. Diyabetik+*V. album* grubunda diyabet grubuna göre glukoz ( $p \leq 0.05$ ), vitamin B<sub>12</sub> ( $p \leq 0.05$ ) ve TOS ( $p \leq 0.05$ ) düzeyleri önemle azalırken, TAC düzeyi önemle yükseldi ( $p \leq 0.05$ ). Sonuç olarak; *V. album* ekstreleri antidiyabetik etkilere sahiptir. Sadece 20 günlük deneme süresince *V. album* ile tedavi edildiğinde glukoz seviyesini önemli ölçüde azaltmıştır. *Viscum album*, diyabetik komplikasyonların oluşumunu önlemeye yardımcı olabilecek güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, Lipoproteinler, Ökse otu, Toplam antioksidan kapasite, Toplam oksidatif durum, Vitaminler

### INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder of multiple etiology distinguished by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both (WHO 2014). By 2035, the number of diabetes

cases worldwide is expected to increase to 592 million. In addition to risk of death from hyperglycaemic crisis, chronic hyperglycemia from diabetes can lead to many long term health issues (Aschner et al. 2014). These sequelae include: Cardiovascular disease, and an increased risk of heart attack or stroke; chronic kidney disease leading to end-stage renal disease; urinary problems;

peripheral neuropathy; skin infections, especially foot ulcers, that are difficult to heal, with the eventual need for lower-extremity amputation; retinopathy leading to vision loss; and sexual dysfunction (Widatalla et al. 2009; Kollias and Ulbig 2010).

The currently available antidiabetic agents include sulfonylureas, biguanides, thiazolidinediones and alpha glucosidase inhibitors and are widely used to control the hyperglycemia. Traditional medicinal plants having antidiabetic properties can be a useful source for the development of safer and effective oral hypoglycemic agents. More than 350 traditional plants are used in the treatment of diabetes mellitus, which have been recorded (Jung et al. 2006). Only a small number of these have received scientific and medical evaluation to assess their efficacy. However, plant remedies are the mainstream of treatment in underdeveloped regions. One of the great advantages of medicinal plants is that these are readily available and have very low side effects. The phytoconstituents showing hypoglycemic effect includes glycosides, alkaloids, terpenoids, flavonoids, carotenoids, that are frequently implicated as having antidiabetic effect (Malviya et al., 2010).

*Viscum album* belongs to the family Loranthaceae. It is also called as mistletoe. *Viscum album L.* is an evergreen dioecious small shrub growing half parasitically on a tree host in temperate Europe and Western Asia. In Anatolia of Turkey, the plant grows on different host trees and shrubs (Miller 1982). *Viscum album* is locally known as "ökse otu" and widely utilized for the treatment of epilepsy, diabetes mellitus, cancer, hypertension, headache, and rheumatoid arthritis in various regions of Turkey (Baytop 1984; Simsek et al. 2004). Extracts of the *V. album* leaves was reported to exert a beneficial effect to alleviate the symptoms of diabetes in local medicines (Gray and Flatt 1999; Orhan et al. 2005). *Viscum album* has been shown also to relieve the diabetic symptoms of severely hyperglycaemic streptozotocin-diabetic mice (Swanston-Flatt et al. 1989).

The aim of present investigation is to evaluate the antidiabetic and antioxidant activities of *V. album* extracts on streptozotocin (STZ) induced diabetic rats.

## MATERIALS and METHODS

### Plant materials

*Viscum album* extract was purchased from VSM (Geneesmiddelen BV, Holland, *Viscum album V30*) herbal drug preserved at room temperature protected from light until use experiments.

### Experimental animals

Thirty two female Wistar rats, aging 6-7 weeks and weighing 200-250 g, were included in the present study. The animals were provided by the Experimental Animal Center of Yuzuncu Yil University, Turkey. All the animals were maintained under laboratory conditions of temperature (22±2°C), humidity (45±5 %) and 12h day: 12h night cycle and were allowed access to food as standard pellet diet and water were available ad libitum throughout the 20 days of experimental period.

### Experimental design and treatment schedule

Rats were made diabetic by a single intraperitoneal injection of 45 mg/kg STZ (Sigma, USA), pH: 4.5 in 0.1M citrate buffer in a volume of 1ml/kg bw (Karabay et al. 2006). After 72 hours the blood was taken by tail puncture and the plasma glucose level of each rat was

determined by blood glucose measurement using a blood glucose monitoring system (eBSensor eB-G). Rats with a plasma glucose range of 250 mg/dl were considered diabetic and included in the study.

The rats were randomly divided into 4 groups:

Group I (control, n = 8) was fed with normal pellet diet,

Group II (*V. album*, n = 8) rats treated with *V. album* 10 mg/kg (Oztabak 2005) were given orally for 20 days of experimental period,

Group III (diabetic, n = 8), rats were injected with single dose of STZ 45 mg/kg, intraperitoneally,

Group IV (Diabetic + *V. album*, n = 8), rats were injected with single dose of STZ 45mg/kg, intraperitoneally, and rats treated with *V. album* 10 mg/kg were given orally for 20 days of experimental period.

After 20 days of administration, all animals were decapitated, blood was collected and serum was separated immediately.

### Biochemical analysis

At the end of experimental period, rats were fasted overnight, anaesthetized, with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (70 mg/kg b.w /rat) with 8 mg/kg dose of xylazine. The animals were continually monitored until total loss of consciousness was reached, as indicated by a total lack of response after a foot pinch then blood samples taken through the heart puncture of rats. Blood was collected, allowed to clot on ice and subsequently subjected to centrifugation (Allegra X-15R Centrifuge 4000 RPM at 4°C for 10 min) serum was collected and stored at -80 °C until assayed. Serum concentrations of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, triglyceride, folic acid, vitamin D, vitamin B12 and glucose were determined by using automatic biochemical analyzer (Abbott Architectc1 16200, Spectrophotometer, Germany). TAC and TOS were determined using a commercial kit (Rel Assay Diagnostic, Van, Turkey).

The percentage ratio of TOS to TAC indicated oxidative stress index (OSI), an indicator of the degree of oxidative stress (Erel, 2004; 2005). To perform the calculation, the resulting unit of TAC (mmol Trolox equivalent/litre) was converted to µmol equivalent/litre and the OSI value was calculated using the following formula:

$$OSI = [(TOS, \mu\text{mol/L}) / (TAC, \text{mmol Trolox equivalent/L}) \times 100] \text{ (Erel, 2005)}.$$

### Statistical analysis

The data reported were submitted to ANOVA using Statistica-Statsoft® 7.0 and represent the means ± standard deviation values. Differences among treatments were analyzed by Tukey's test. A P value of 0.05 was used as the cut-off for statistical significance.

## RESULTS

The levels of glucose (p≤0.05), vitamin B12 (p≤0.05), TOS (p≤0.05) were significantly decreased and TAC (p≤0.05) increased in diabetic+*V. album* group compared to diabetic group. Vitamin D, cholesterol, HDL levels were not significant among the groups. Folic acid level was significantly higher in diabet and diabetes + *V. album* group compared to the other two groups. The triglyceride level of *V. album* group was significantly higher than the other three groups (Table 1).



**Table 1.** Changes in the serum glucose, folic acid, vitamin B12, vitamin D, total cholesterol HDL and triglyceride, TOS, TAC levels in different groups

Parameters	Control	<i>V. album</i>	Diabetic	Diabetic+ <i>V. album</i>
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Glucose (mg/dl)	193.14± 31.23a	231.71± 61.41a	700.50± 164.08c	514.62±235.15b
Folic Acid (ng/ml)	15.01± 0.85a	13.84± 0.59a	16.32± 1.16b	16.28± 1.64b
Vitamin B <sub>12</sub> (ng/ml)	355.85± 24.92 <sup>a</sup>	355.42± 32.23 <sup>a</sup>	543.62± 109.44 <sup>b</sup>	410.75± 109.54 <sup>a</sup>
Vitamin D (ng/ml)	71.11± 6.79 <sup>a</sup>	65.34± 10.02 <sup>a</sup>	72.20± 9.51 <sup>a</sup>	68.57± 14.45 <sup>a</sup>
Cholesterol (mg/dl)	66.85± 7.60 <sup>a</sup>	65.28± 8.17 <sup>a</sup>	59.37± 12.63 <sup>a</sup>	63.25± 8.82 <sup>a</sup>
Triglyceride (mg/dl)	92.85± 27.55 <sup>a</sup>	122.0± 51.73 <sup>b</sup>	65.12± 25.69 <sup>a</sup>	98.12± 20.82 <sup>a</sup>
HDL (mg/dl)	43.40± 5.88 <sup>a</sup>	42.20± 5.58 <sup>a</sup>	37.0± 9.24 <sup>a</sup>	39.77± 5.35 <sup>a</sup>
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eq/L)	2.91±0.25 <sup>c</sup>	3.21±0.18 <sup>c</sup>	4.15±0.37 <sup>a</sup>	3.91±0.22 <sup>b</sup>
TAC (mmol Trolox Eq/L)	1.44±0.11 <sup>b</sup>	2.15±0.16 <sup>a</sup>	0.98±0.14 <sup>c</sup>	1.35±0.17 <sup>b</sup>
OSI	0.202±0.061 <sup>b</sup>	0.149±0.094 <sup>c</sup>	0.423±0.079 <sup>a</sup>	0.290±0.088 <sup>b</sup>

a, b, c: The difference between group averages with different letters in the same row is statistically significant ( $p \leq 0.05$ )

## DISCUSSION

Diabetes mellitus is a serious chronic metabolic disease, in 2014, about 387 million people worldwide, or 8.3% of the adult population aged 20-79 years, are estimated to have diabetes with increasing incidence (IDF 2015). DM is featured with high blood glucose levels that result from insulin resistance in peripheral tissues or impaired insulin synthesis in pancreas (De Silva et al. 2012). In addition to the impairment in glucose and carbohydrate metabolism, the disease causes abnormalities in the metabolism of lipid and protein. The high blood glucose is also associated with generation of reactive oxygen species and consequent oxidative damages particularly in liver, kidney, and pancreas (Kakkar et al. 1998).

STZ an antibiotic produced by *Streptomyces achromogenes*, possesses pancreatic  $\beta$ -cell cytotoxic effect (Weiss 1982). STZ has been widely used for inducing diabetes mellitus in a variety of animals. STZ causes degeneration and necrosis of pancreatic  $\beta$ -cells (Uchigata et al. 1982). In this study it was clearly demonstrated that STZ at a dose of 45 mg/kg was able to provoke a sustained hyperglycemia in both diabetic group and diabetic +*V. album* group, the level of serum glucose was increased significantly ( $p < 0.05$ ) in diabetic group and diabetic+*V. album* group in comparison with control group (Table 1). Diabetic rats have high blood glucose as 700,50 mg/dl and it was significantly decreased glucose level when treated with *V. album* to 514,64 mg/dl in only 20 days of experiment, this decline was statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). In previous studies had reported a significant decrease of plasma glucose was not clearly demonstrable in this insulin-deficient model (Swanston-Flatt et al. 1989), which indicates that leaf and stem of mistletoe contain water soluble natural product(s) which directly stimulate insulin secretion from clonal  $\beta$ -cells. Mistletoe leaves was reported to exert a beneficial effect to alleviate the symptoms of diabetes in local medicines worldwide (Gray and Flatt 1999). *Viscum album* is a traditional plant using

for the treatment of diabetes. 1-10 mg/ml aqueous extracts can stimulate the insulin secretion. The presence of insulin-releasing natural compounds may contribute the antidiabetic effects of this plant. *Viscum album* relieves the diabetic symptoms the polyphagia, body weight loss and polydipsia. *Viscum album* extracts act in the early stage of the insulin secretory pathways Gray and Flatt (1999) had found water soluble heat resistant insulin releasing compounds in *V. album* and suggested this plant as a new oral hypoglycemic agent. *V. album* extracts have antidiabetic effects.

One of the common mechanisms suggested in the pathogenesis of diabetes diseases is the formation of reactive oxygen species (ROS) that leads to oxidative stress (Tiwari et al. 2013). In the recent years there has been an increased interest in ROS generation and its role in the development of complications of diabetes. In relation to this concern, Giacco and Brownlee (Giacco and Brownlee 2010) showed that persistent hyperglycemia can enhance the oxidative stress by increasing glucose auto-oxidation, non-enzymatic protein glycation, and activation of polyol pathway. Numerous studies have demonstrated that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis and progression of diabetes and its complications (Simmons 2006; Kaneto et al. 2007). Oxidative stress has recently been shown to be responsible, at least in part, for the  $\beta$ -cell dysfunction caused by glucose toxicity. Under hyperglycemia, production of various reducing sugars such as glucose-6-phosphate and fructose increases through glycolysis and the polyol pathway. During this process, ROS are produced and cause tissue damage (Hunt et al. 1990). However, besides the increased production of reactive species following hyperglycaemia, the intracellular antioxidant defense is of great importance in disease progression and development of diabetes complications (Gupta and Chari 2005). In the presented study the effect of *V. album* on the antioxidant status of the STZ-diabetic rats was investigated. For this purpose the effects of *V. album* extract on activity of TAC and TOS of diabetic rat's serum

were studied. TOS and TAC are biomarkers of oxidative stress that are measured easily, fast and economic. In this sense, TOS is the measurement of different oxidant species in an organism (Aslan et al. 2014; Barbosa et al. 2014) that was shown to be of help in the diagnosis of different pathologies (Erel 2005). TAC determinations are of help to study the capacity of known and unknown antioxidants and their additive, synergistic and/or antagonistic actions, in chemical and biological systems (Fraga et al. 2014). Currently TAC assays have applications in human and veterinary medicine to evaluate overall defense status against oxidative stress and biomedical sciences (Bartosz and Bartosz 1998).

Diabetes has so many complications as diabetic retinopathy, nephropathy, neuropathy and hypertension. There is a correlation between complications and oxidant/antioxidant status of the body. The TOS ratio increased in diabetic patients and especially patients with retinopathy. Unlike the amount of TAC decreased in DM. This negative situation have important role on the formation of DM and its complications. Logically TAC levels are reduced while the TOS levels are increased in DM. In this study similar results were determined the TAC levels which decreased in diabetic rats, but quantity of TAC increased in diabetes when *V. album* was given. TAC is a measure of the antioxidant capacity of biological samples analyzed, it is not a single compound. But it would be better to compare the levels of individual antioxidant with TAC. In this study, the levels of TOS were significantly increased ( $p \leq 0.05$ ) and TAC ( $\leq 0.05$ ) decreased in diabetic group compared to diabetic+*V. album* group. *V. album* extracts samples revealed significant antioxidant and radical-scavenging properties and reported oxidative stress is associated with the development and progression of diabetes mellitus.

Oxidative stress index (OSI) was defined as the ratio of TOS level to TAC level. In this study the highest ratio was found in diabetic group, because of producing so much oxidant in there disease. But when rats consumed *V. album* during diabetes these ratio decreased, it is meant in that *V. album* had antioxidant compound, effects and had positively changed this ratio. This is very impressive results, because *V. album* had positive effects to diminish the amount of oxidant produced in DM, which all of them are so harmful and cause the diabetic complications. In addition to the impairment in glucose and carbohydrate metabolism, the disease causes abnormalities in the metabolism of lipid and protein (Kuzuya et al. 2002). In Japan totally 1771 men and women were analyzed for lipid profile detection, diabetic men total cholesterol and HDL in women triglyceride were the most predictive parameters, that lipid component of serum, lipid metabolism have significant changes during DM. In the presented study cholesterol, triglyceride and HDL levels were not significantly affected by *V. album* or DM (Sone et al. 2012).

Vitamin B<sub>12</sub> or cobalamin plays very important role in DNA synthesis neurological function and optimal haemotopoiesis. Deficiency of this vitamin will result in disruption of methylation process and accumulation of homocysteine. Thus the vascular endothelium will be toxically affected. There is a correlation between vitamin B<sub>12</sub> deficiency and type 1 and 2 DM (Liu et al. 2006). Bhatt and Linnell (Bhatt and Linnell 1983) and Bhatt et al. (Bhatt et al. 1983) also stated that plasma vitamin B<sub>12</sub> levels were almost doubled in the diabetic rat and 'abnormal' vitamin B<sub>12</sub> metabolism was suggested as one explanation for the reported elevated methylmalonic acid levels in the same animals. The vitamin B<sub>12</sub> status of the diabetic animals in

other study did not differ from that of control animals (Bailey et al. 1989). In the presented study within 20 days, vitamin B<sub>12</sub> levels were not changed in all group except diabetes group, diabetes group had the highest amount of vitamin B<sub>12</sub> levels.

Some researchers said that folic acid supplementation of diabetic people were significantly reduced homocysteine levels and lowered cardiovascular risks (Audelin and Genest 2001). Folic acid diminishes the risk of neural tube defects of the fetus. Supplementing rats with folic acid decreased teratogenicity induced by diabetes mellitus. DM affects folate metabolism, create a functional folic acid deficiency in embryo. In the presented study the folic acid levels were not changed drastically, only slight alterations were found (Table 1).

Vitamin D is an important vitamin for the normal growth and skeletal system. But in the last years the function and magnificent effect to almost all systems were described. Vitamin D is known as sunshine vitamin and has great vital function on the regulation and absorption of calcium and phosphorous, facilitate the normal role of the immune system is very surprising, too. Reduction the risk of muscle sclerosis, decreasing heart disease, and the regulating mood and warding off depression and fibromyalgia and significant effect on pancreatic  $\beta$ -cell function are the sum of function of vitamin D. Some studies showed that adequate vitamin D levels in the blood have positive effect on the pancreatic  $\beta$ -cell. The person has enough vitamin D they start normal pancreatic function. If one has normal blood vitamin D levels, pancreas functions properly. When vitamin D receptors were removed, inadequate production of insulin was measured (Zeitze et al. 2003). Vitamin D influences the regulation of calcium in the blood and Ca<sup>2+</sup> help control insulin secretion So if one has altered Ca<sup>2+</sup> levels,  $\beta$ -cell function will be spoiled, when the blood level of Ca<sup>2+</sup> changes, the  $\beta$ -cell function will be affected. If someone has  $\geq 25$  ng/ml blood vitamin D level can have low detection rate in type 2 diabetes (Zeitze et al. 2003; Davidson et al. 2013). In this study, there was no importance in terms of vitamin D levels among the groups.

## CONCLUSION

In the presented study, diabetic rats have high blood glucose and it was significantly decreased glucose level when treated with *V. album* in only 20 days of experiment. Additionally *V. album* extracts samples revealed significant antioxidant and radical-scavenging properties and reported oxidative stress is associated with the development and progression of diabetes mellitus. Furthermore, the OSI clearly showed that *V. album* had a stronge antioxidant activity that can help to prevent the formation of diabetic complications.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Van YU Directory of Scientific Research Project as (2016- TYL-5198) Project number. The same study was presented at IMCOFE IV, Roma, ITALYA, 23-25 Agustus 2017.

## REFERENCES

- Aschner P, Aguilar-Salinas C, Aguirre L, Franco L, Gagliardino JJ, de Lapertosa SG, Seclen, S, Vinocour M (2014). Diabetes in South and Central America, an update. *Diabetes Res Clin Pract*, 103 (2), 238-243.
- Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E (2014). The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical Biochemistry*, 47(6), 393-397.

- Audelin MC, Genest J (2001).** Homocysteine and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 159 (2), 497-511.
- Bailey LB, Molloy A, Scott J, Rice D (1989).** Streptozotocin-induced diabetes is not a model for methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis*, 12(4), 429-435.
- Bhatt HR, Linnell JC (1983).** Induction of ethylmalonic acidemia with streptozotocin: a possible experimental model for the study of methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis*, 6, Suppl, 2.
- Bhatt HR, Linnell JC, Matthews DM (1983).** Can faulty vitamin B12 (Cobalamin) metabolism produce diabetic neuropathy? *The Lancet*, 3, 572.
- Barbosa CF, Tonin AA, Da Silva AS, De Azevedo MI, Monteiro DU, Waczuk EP, Faccio L (2014).** Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. *Parasitology*, 141 (13) 1761-1768.
- Bartosz G, Bartosz M (1998).** Antioxidant activity: What do we measure? *Acta Biochim Pol*, 46 (1), 23-29.
- Baytop T (1984).** Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), *Publications of IX Istanbul University*, 243.
- Davidson MB, Duran P, Lee ML, Friedman TC (2013).** High-dose vitamin D supplementation in people with prediabetes and hypovitaminosis. *Diabetes Care*, 36 (2), 260-266.
- De Silva DD, Rapior S, Hyde KD, Bahkali AH (2012).** Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56 (1), 1-29.
- Erel O (2005).** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-1111.
- Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M (2014).** In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta*, 1840 (2), 931-934.
- Giacco F, Brownlee M (2010).** Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058-1070.
- Gray AM, Flatt PR (1999).** Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *J Endocrinol*, 160 (3), 409-414.
- Gupta MM, Chari S (2005).** Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with diabetic retinopathy. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49 (2), 187.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP (1990).** Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*, 39(11), 1420-1424.
- International Diabetes Federation (2015).** Diabetes Atlas: Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes Res Clin Pract*, 109 (3), 461-465.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK (2006).** Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem*, 13, 10, 1203-1218.
- Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra, J (1998).** Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science*, 94, 623-632.
- Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Sakamoto KY, Matsuoka TA, Yamasaki Y (2007).** Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal*, 9(3), 355-366.
- Karabay G, Zağyapan R, Take G (2006).** An ultrastructural study of effects of streptozotocin induced diabetes on rats peripheral nerves. *Journal of Uludağ University Medical Faculty*, 32 (3), 77-81.
- Kollias AN, Ulbig MW (2010).** Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 107(5), 75-83.
- Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Shima K (2002).** Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 55 (1), 65-85.
- Liu KW, Dai LK, Jean W (2006).** Metformin-related vitamin B12 deficiency. *Age and Ageing*, 35( 2), 200-201.
- Malviya N, Jain S, Malviya SAP (2010).** Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Pol Pharm*, 67(2), 113-118.
- Miller AG (1982).** *Viscum album L.* Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, 7, 547.
- Orhan DD, Aslan M, Sendogdu N, Ergun F, Yesilada E (2005).** Evaluation of the hypoglycemic effect and antioxidant activity of three *Viscum album* subspecies in streptozotocin-diabetic rats. *J ethnopharm*, 98 (1), 95-102.
- Öztabak KÖ (2005).** The Anti-Carcinogen Activities of Lectins and Viscum Album Agglutinin (VAA). *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 2, 55-59.
- Simmons RA (2006).** Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 40(6), 917-922.
- Simsek I, Aytetin F, Yesilada E, Yildirimli S (2004).** An ethnobotanical survey of the Beypazari, Ayas, and Gudul district towns of Ankara Province (Turkey). *Economic Botany*, 58, 4.
- Sone H, Tanaka S, Tanaka S, Iimuro S, Ishibashi S, Oikawa S, Yamada N (2012).** Comparison of various lipid variables as predictors of coronary heart disease in Japanese men and women with type 2 diabetes sub analysis of the Japan diabetes complications study. *Diabetes Care*, 35 (5), 1150-1157.
- Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey, CJ, Flatt PR (1989).** Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol Lat*, 26(1), 51-55.
- Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI (2013).** Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *Journal of Biomarkers*, 10, 1155, 8-17.
- Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, & Okamoto H (1982).** Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*, 257(11) 6084-6088.
- Weiss RB (1982).** Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rep*, 66, 427-438.
- Widatalla A, Mahadi SE, Shower M, Elsayem H, Ahmed M (2009).** Implementation of diabetic foot ulcer classification system for research purposes to predict lower extremity amputation. *J Diabetes Dev Ctries*, 29 (1), 1.
- World Health Organisation (2014).** About diabetes. World Health Organization: Retrieved April 4, 2014.
- Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben, RG (2003).** Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB Journal*, 17 (3), 509-511.





## The Levels of Vitamins, Antioxidants and Heavy Metals of Gastric Cancer Patients Before and After Treatment

İnci DOĞAN SÖĞÜTLÜ<sup>1\*</sup> Nihat MERT<sup>2</sup> Handan MERT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ministry of Agriculture and Forestry, Food and Control Directorate, Food Business and Codex Department, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

Received: 14.06.2019

Accepted: 19.07.2019

### ABSTRACT

Gastric cancer, one of the most important diseases threatening human life, has a different etiology and affects the antioxidant system, mineral and vitamin levels. For this purpose, the study was performed in people who were diagnosed with gastric cancer and came to the Oncology Clinic of the Medical Faculty Research Hospital. A total of 77 subjects were selected as study materials, 30 of whom were healthy, 32 male and 47 female with adenocarcinoma. Prior to the treatment of cancer patients, detailed biochemical analyzes were performed on blood samples taken after chemotherapy. According to the elemental analysis technique the levels of ceruloplasmin, GSH-Px, SOD, retinol acetate and  $\alpha$ -tocopherol by Mg, Fe, Zn, Cu, Cd, Pb, Ca and Co of serum and whole blood were measured. GSH-Px, SOD, retinol acetate,  $\alpha$ -tocopherol levels were measured for each individual. Mg ( $p \leq 0.001$ ), Fe ( $p \leq 0.05$ ), Ca ( $p \leq 0.01$ ) were significantly different, but there was no statistically significant difference between the groups. Although there were differences between the groups in the other parameters examined, no statistical significance was found. Ceruloplasmin, GSH-Px levels were significantly reduced in cancer patients before treatment compared to controls ( $p \leq 0.0001$ ), whereas levels of SOD, retinol acetate ( $p \leq 0.07$ ) and  $\alpha$ -tocopherol ( $p \leq 0.05$ ) were increased before treatment of cancer patients. As a result, changes in the levels of elements, enzymes, vitamins and antioxidants have been observed in gastric cancer, especially after administration of Cisplatin, decrease in serum Mg and ceruloplasmin and increase in SOD activity is remarkable.

**Keywords:** Antioxidants, Human, Gastric cancer, Minerals, Vitamins, Heavy metal

### ÖZ

### Mide Kanserli Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Bazı Vitamin, Antioksidant ve Ağır Metal Düzeyleri

İnsan hayatını tehdit eden hastalıkların en önemlilerinden biri olan mide kanseri, farklı etiyojisi olup antioksidan sistem, mineral madde ve vitamin düzeylerini etkilemektedir. Bu amaçla Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Onkoloji Kliniğine gelen ve mide kanseri tanısı konmuş kişilerde çalışma yapıldı. 30 sağlıklı kontrol, 32 erkek 15 kadından oluşan 47 mide adenokarsinom tanısı konmuş hasta, toplam 77 kişi çalışma materyali olarak seçildi. Kontrollerden kanserli olanların tedavi öncesinde, kemoterapiyi takiben alınan kan örneklerinde detaylı biyokimyasal analizler yapıldı. Serum ve tüm kanda tekniğine uygun olarak Mg, Fe, Zn, Cu, Cd, Pb, Ca, Co element analizleri ile seruloplazmin, GSH-Px, SOD, retinol asetat,  $\alpha$ -tokoferol düzeyleri herbir birey için ölçüldü. Mg ( $p \leq 0.001$ ), Fe ( $p \leq 0.05$ ), Ca ( $p \leq 0.01$ ) düzeylerinde önemli değişim gösterirken incelenen diğer parametrelerde gruplar arası farklılık olmasına rağmen istatistiksel önem saptanmadı. Seruloplazmin, GSH-Px düzeyleri kanserli, tedavi öncesi grupta kontrollere göre önemli düzeyde azalmış ( $p \leq 0.0001$ ) olarak bulunurken, SOD, retinol asetat ( $p \leq 0.07$ ) ve  $\alpha$ -tokoferol ( $p \leq 0.05$ ) düzeyleri kanserli bireylerde tedavi öncesinde artmış olarak saptandı. Sonuç olarak mide kanserinde gerek element, vitamin ve gerekse antioksidan enzim düzeylerinde değişimler saptanmış olup, özellikle Cisplatin uygulanmasını takiben serum Mg düşüşü, ayrıca seruloplazmin azalması, SOD aktivite yükselmesi dikkati çeker niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidantlar, İnsan, Mide kanseri, Mineraller, Vitaminler, Ağır metal

### GİRİŞ

Mide kanseri insan hayatını tehdit eden en önemli hastalıkların başında gelmektedir. Yakın zamana kadar

erkeklerde en sık rastlanılan kanser, mide kanseri iken gün geçtikçe erkeklerde akciğer kanserindeki artış dikkati çekmektedir. Mide kanserinin etiyojisi, diğer organ kanserlerinin ya da diğer bir ifadeyle kanserin etiyojisi

gibi henüz tam anlamıyla açıklanamamaktadır. Yalnız kalıtımın % 7-8 oranında etkili olduğu ileri sürülmekte, kan grubu ile ilişkilendirme yapılmakta, ekonomik olarak gelir düzeyi düşüklüğü ile ilişkilendirilmekte ve sosyal olarak kentlerde yaşamının risk faktörü olduğu söylenmekte, diyet alışkanlıklarının mide kanseri oluşumunda etkili olabileceği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğunu taşıdığı farklı etioloji ve prognozu ile tehdit eden mide kanseri vakalarında organizmada antioksidant sistem, mineral madde ve vitamin düzeylerinde değişiklikler olmaktadır. Kanser; neoplazi ve malignite genellikle teknik ve popüler literatürde birbirlerine dönüşebilen anlamlarda kullanılır (Falchuk 1977). Mide kanseri ABD deki tüm kanser tipleri arasında görülme sıklığı olarak 22800 hastayla 14. mortalite olarak 14700 ölüm ile 8. sıradadır (Nomura ve ark. 1991). Hollanda'da kanserden ölüm nedenlerinde 4. sıradadır. Mide kanserine rastlanılmada dünyanın farklı bölgelerinde farklılıklar görülmektedir. En sık olarak Japonya, Çin, Şili, Karayipler'in bazı kısımları ve Doğu Avrupa'da rastlanırken, Finlandiya, Avusturya, Çekoslovakya'da orta derecede, ABD, Avusturalya, Yeni Zelanda ve diğer Anglo Sakson ülkelerde şu anda daha az görülsün bile (Menteş 1982; Bonenkamp ve ark. 1999), 1930' lu yıllarda bu ülkeler için oldukça tehlikeliydi. Geçen yıllar içinde tüm dünyada ve ülkemizde benzer şekilde görülme azlığı saptanmıştır (Örmeci ve Aktan 1988; Mayer ve ark. 1991; Winawer ve ark. 1992). Genel olarak çok gelişmiş ülkelerde daha sık, endüstrileşmiş olanlarda ise daha nadir gözlenir. Dikkati çeken bir durum ABD'de saptanmıştır; mide kanserinde azalma olurken proksimal mide kanseri sıklığı artmıştır.

Pilor ve kardiada gelişen kanserler hariç mide kanseri çoğunlukla ülser oluncaya, kanayınca, tıkanma veya metastazlara neden oluncaya kadar teşhis edilmez (Menteş 1982). Mide kanserlerinin küratif tedavisindeki tek yol cerrahi müdahaledir (Douglass ve Nova 1985; Örmeci ve Aktan; 1988 Winawer ve ark. 1992). Tümörün tamamen çıkarılması, komşu lenf nodüllerinin rezeksiyonu tedavi şansını yükseltir. Genellikle distal kanserlerde subtotal gastrektomi, proksimal kanserlerde totale yakın veya total gastrektomi uygulanır (Winawer ve ark. 1992). Kemoterapide opere edilemeyen adenokarsinomlarda semptomları azaltmak, yaşamı uzatmak için yapılır. Kombine kemoterapi uygun olup, en fazla 5-fluoro urasil, adriamisin ve mitomisin-C kullanılması sonucunda hastaların %30-50 sinde tümör kitlesinde %50 den fazla azalma olmaktadır. Tamamen kaybolma nadirdir, yaşamı uzatmadığı da rapor edilmiştir (Le Chevalier ve ark. 1985; Mayer ve ark. 1991).

Radyoterapi ve 5-floro urasilin birlikte uygulanmasında yaşam süreci bir miktar artmıştır (Allum ve ark. 1989). Semptomlara bağlı olarak destekleyici paraneoplastik nutrisyon yapılması kemoterapi, pre ve post operatif dönemin iyi geçmesini sağlar (Allum ve ark. 1989). Lokal ve ileri metastazlarda ikinci rejenerasyon kombinasyonu tedavileri önerilmiştir. Bunlar EAP (etoposid+duksorubusin+cisplatin), ELF (etoposid+5-fluorourasil+leukovorin), FP (cisplatin ile 5-fluorourasil'in devamlı infuzyonu) FAMTX (yüksek doz metotreksat +5FU+doksorubusin) kombinasyonlarıdır (O' Connell 1992; Wils 1996). Dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanırken, radikal ve reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddelere "antioksidant" denir. Sık rastlanılan radikaller; Hidrojen (H<sup>+</sup>), Süperoksit (O<sub>2</sub>) hidroksil (OH<sup>-</sup>), Peroksit radikali (HO<sub>2</sub>), Nitrojenoksit (NO), Nitrojendioksit (NO<sub>2</sub>)'dir. Antioksidantlar yukarıda

sayılan radikalleri inhibe eden sistemlerdir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, tokoferol, askorbat, glutatyon, ürik asit, glukoz gibi maddeler antioksidant maddelerdir (Dündar ve Aslan 2000). Vitaminler özel hücre fonksiyonların yerine getirilmesinde vücudun eser miktarlarda gerek duyduğu organik bileşiklerdir. Yağda eriyen bir vitamin olan A vitamini ve β-karoten; Vitamin A, retinol olarak bilinen bir alkoldür (Kalaycıoğlu ve ark. 2000). β-karoten'in, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidant vazife gördüğü tespit edilmiştir (Akkuş 1995). Vitamin E besinlerle alınması şart olan, yağda eriyen antioksidant bir vitamin olduğu bulunmuştur. Daha sonraki yıllarda ise vitamin E tanımlanarak saflaştırılmıştır. Doymamış yağ asitlerinin gıdalarla fazla alınması vitamin E ihtiyacını artırır. Yağda eriyen bir vitamin olduğu için lipit emilim bozukluklarında vitamin noksanlığı ortaya çıkabilir. Noksanlık durumunda eritrositlerin peroksidasyona duyarlılığı artmakta ve bu nedenle anormal hücre membranı oluşmaktadır (Mert ve ark. 1999). Wu ve ark. (2002) all-trans retinoik asidin (ATRA), mide kanseri hücresinde metastazı ve ilgili proteinleriyle arasındaki ilgiyi araştıran çalışmalarında (invivo, invitro) 0,7 mg/kg, iz dozunda ATRA bir gün aralıklarla doku kültürüne verilmesinin tümörün ve karaciğer metastazlarının büyümesini engellediğini, metastazla ilgili proteinlerin düzenlenmesi yoluyla bunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. ATRA angiogenezi engellediğinden klinik olarak da rahatlıkla kullanılabilir bir maddedir. Jacobs ve ark. (2002) Vitamin E ve C nin mide kanserinden ölümü azaltması ve koruması üzerine yaptıkları çalışmada bağlantı bulamazken, Vitamin E ve C nin serbest radikalleri azaltıcı, nitrosamin oluşumunu inhibe edici etkilerine vurgu yapmışlardır. Stahelin ve ark. (1991) İsviçre'de 15 yıl süreli 3000 erkekte antioksidant vitaminler A, E, C, karoten ile kanser oluşması arasındaki ilgiyi arayan çalışmalarında, mide ve bronş kanserlerinde düşük plazma karoten, mide kanserinde ise düşük plazma Vit-A düzeyi bulmuşlardır. Ayrıca düşük plazma karotinin bronş kanseri oluşması ile yüksek oranda riske, düşük karoten ve A vitamini ile tüm kanser türlerinin oluşmasında pozitif ilgiye dikkat çekmişlerdir. Chen ve ark. (1992) Pekin'deki çalışmasında 65 farklı bölgede kanserden ölüm oranında düşük plazma antioksidant düzeyinin etkili olduğunu, mide kanserinde retinolden bağımsız olarak β-karotenin koruyucu etkisi olduğunu vurgulamıştır.

Ağır metaller iz elementlerdir ve dansitesi suya göre en az 5 kez daha fazladır. Stabil elementler olup vücut tarafından metabolize edilemezler, gıda zinciri ile insanlara gelir, biyoakümülyasyon şekillenir. En çok bilinen zararlı metaller Al, Ar, Cd, Cu, Pb, Hg ve Ni dir. Diğer ağır metaller bunlar kadar zararlı değildir. Genelde vücutta temel görevlere sahip değildir ve oldukça toksiktir. İçme suları, gıda ve insan yapımı binlerce kimyasal madde ve ürünlerinde bulunur. Vücuda solunum, sindirim ve deri emilimi yoluyla alınır (Wogan ve ark. 2004; Anonymus 2005). İz elementler, vücuttaki toplam ağırlığı 4 mg'dan az olduğu halde insanda, biyolojik fonksiyonlar için çok gerekli olan metallerdir. Bunlar vücutta sayısız enzimatik reaksiyonlardaki enzimlerin en az yarısının kofaktörüdürler (Yaylalı ve Sözer 1995). Bakır, çinko ve manganez gibi geçiş metalleri intra ve ekstrasellüler oksidazlar, oksijenazlar ve dismutazların kofaktörüdür. Ayrıca demir, bakır, manganez ve diğer metal iyonlarının kanda enzimatik olmayan lipid peroksidasyonuna aracılık ettikleri bilinir (Leonhardt ve ark. 1996). Bakır, magnezyum, krom, çinko, kalsiyum, selenyum gibi mineral

ve iz elementlerin de diyetlerdeki azlığı ya da fazlalığının kardiovasküler hastalıkların orijininde etkili olduğu kabul edilmektedir (Sürücüoğlu 1992). Kimyasal ve radyasyon gibi etkilere üretilen aktif oksijen türleri veya oksidantlar hiperoksi durumu DNA hasarı yapar, insan ve hayvan hücrelerinde mutajenezise yol açar. Ayrıca doku kültürü çalışmalarında aktif oksijen türlerinin malign transformasyonlar yaptığı bildirilmiştir (Parshad ve Sanford 1971; Hoffman ve Meneghini 1979; Weitzman ve ark. 1985). Mutajenite serbest radikallerin artan miktarlarına bağlı olarak şekillenen kromozomal hasarlar neticesinde şekillenir. Şu anda benimsenen görüş ise hidroksil radikallerinin DNA ile direkt interaksyonu oksijenin mutajenik kapasitesini doğurur yönündedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit radikalinin geçiş elementleri ile ilişkisi sonucu DNA hasarı üretilen OH radikalleri üretilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit direkt olarak DNA ile oksidatif lezyon üreten ilişkiye giremez. Karsinojenik bir molekül olan nitroloasetik asit, Cu ve Fe oksidatif DNA hasarını arttıran moleküllerdir (Aruama ve ark. 1991).

Sunulan çalışma ile mide kanserli ve kanser tedavisi görmüş hastalarda geniş bir metabolik profil çalışması yapmak, tedavi öncesi ve sonrasında muhtemel değişimleri belirlemek hedeflenmiştir. Bu amaçla Vitamin-A, E, SOD, GSH-Px, Seruloplazmin, Cu, Zn, Fe, Mg, Cd, Pb, Ca, Co düzeyleri, kanserli bireylerin tüm kan, serum ve plazmasında incelenecektir. Belirlenen değerler yardımıyla kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerin kan değerleri farklılıkları, uygulanan tedavinin hastalık ve kan parametreleri üzerine etkisi yorumlanacaktır.

## MATERYAL ve METOT

### İnsan materyali

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji Bölümü'ne başvurup mide kanseri tanısı konulan hastalardan alındı. Yaşları 45-76 arasında değişen 32 erkek, 15 bayan toplam 47 hasta çalışmada kullanıldı. Hastaların hepsine endoskopik biyopsi ile mide adenokarsinomu tanısı konuldu. Daha sonra hastalar akciğer grafisi, batin bilgisayarlı tomografisi, biyokimya, hemogram ve gerektiğinde MR (magnetic resonans) kullanılarak evrelendirildi. Lokalize evre olan hastalar cerrahi tedaviye uygun olduklarından çalışma dışı bırakıldı. Lokal ileri ve metastatik hastalar sistemik kemoterapiye aday olduklarından çalışmaya alındılar. Tedaviye başlanmadan önce her hasta bilgilendirilerek ve izin alınarak 2 şer tüp kan alındı (antikoagülanlı ve antikoagülanlı normal tüp).

### Kemoterapi şeması

Hastalara cisplatin-5 FUFA (5Flourouracil-Folinik asit) 14 günde bir veya cisplatin-UFT 21 günde bir verildi. Tüm hastaların bu kemoterapiye cevabı 3-4 kür sonra klinik, radyolojik olarak araştırıldı. Alınan tüm kanların (antikoagülanlı) üzerindeki plazma santrifüj edilerek ayrıldı, kalan kısım % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile 3 defa santrifüj edilerek yıkandı ve derin dondurucuda saklandı.

### Ekstraksiyon ve HPLC analizleri (Vitamin-A ve Vitamin-E)

Plazma numunelerindeki vitamin A (retinol asetat) ve vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) düzeyleri Miller ve Yang (Miller ve Yang 1985)'ın belirttiği ekstraksiyon metodu kullanılarak belirlendi. Vitamin A ve vitamin E düzeylerinin HPLC ile ayırımında C 18 kolonu (Tanılar deidore dedektörü ile 325 ve 290 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. (Zaspel ve Csallany 1983). SOD'un rolü, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksit radikalinin (O<sub>2</sub>-) hidrojen

peroksite (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve moleküler oksijene (O<sub>2</sub>) dismutasyonunu hızlandırmaktır. SOD aktivitesi, reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçüldü (Flohe ve Otting 1984; Xia ve ark. 1995). GSH-Px, hidroperoksit ile GSH'ı okside eden reaksiyonu katalizler. Ortamda GR ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) var ise yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), NADPH'ın NADP'ye oksidasyonu ile GSH'a indirgenir (Paglia ve Valentine 1967; Flohe ve Gunzler 1984). GSH-Px enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile otoanalizörde 340 nm' de ultraviyole metotla 37° C' de ölçüldü (Anonymous 1997). Serumda seruloplazmin tayini spektrofotometrik olarak modifiye Ravin metoduna göre gerçekleştirildi (Yenson 1986). Mineral madde analizleri absorpsiyon spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır (Morton ve Roberts,1993).

### İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler Duncan's Multiple Range testi ile istatistiksel olarak yorumlandı.

## BULGULAR

Çalışmada materyal olarak kullanılan bireylere ait kan örneklerinde element ve antioksidant düzeyleri tesbit edildi. Sağlıklı bireyler ile mide kanserli hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası bazı mineral madde düzeyleri Tablo 1 de yer almaktadır. Serum Mg düzeyi sağlıklı kontrol grubu ve mide kanserine sahip bireylerde tedavi öncesi düzey olarak yakın değerlere sahip iken (17.28-17.37 mg/L), tedavi sonrasında 15.78 mg/L düzeyine geldiği bu farklılığın istatistiksel olarak ta p  $\leq$ 0.001 düzeyinde önemli olduğu gösterildi. Kanserli bireylerde tedavi öncesinde serum Fe düzeyi azalma gösterirken (0.82 mg/L), kemoterapi sonrası 1.51 mg/L'e yükselerek, 1.14 mg/L'lik kontrol grubu düzeyine ulaştı. Serum Zn, Cu, Cd ve Co düzeyleri kontrol, tedavi öncesi ve sonrası grupta sırasıyla 0.80-0.91-0.88, 1.41-1.57-1.43, 0.02-0.02-0.03, 0.19-0.21-0.17 mg/L olarak ölçüldü ve istatistiksel olarak değişimler önemli bulunmadı. Serum Pb düzeyleri tedavi sonrası grupta en düşük olarak (0.32-0.31-0.21 mg/L) saptandı. Azalma istatistiksel olarak p  $\leq$ 0.05 düzeyinde önem gösterdi. Serum Ca düzeylerinde gruplar arası önemli farklılık saptandı. Kontrollerde % 8.86 mg iken tedavi öncesinde % 7.20 mg, tedavi sonrasında ise % 8.40 mg düzeyleri ölçüldü. Tedavi öncesi grubun değerlerine göre p  $\leq$ 0.01 düzeyinde istatistiksel önemle düşük olduğu saptandı. Sağlıklı bireyler ile mide kanserli hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası bazı vitamin ve antioksidant düzeyleri Tablo 2 de yer almaktadır. Antioksidant sonuçlardan seruloplazmin değerlerinde kanserli bireylerde tedavi öncesi ve sonrasında kontrollere göre çok önemli düzeyde düşüş saptandı (p  $\leq$ 0.0001). Değerler sırasıyla %67.06- 37.91 -37.19 mg'dır.GSH-Px düzeyi ise kontrol-tedavi öncesi ve sonrası grupta 4654.57-4483.20-4407.89 U/l olarak hesaplanırken gruplar arası farklılıkta istatistiksel önem bulunamadı. Retinol asetat miktarında kanserli tedavi öncesi grupta yükselme (0.50  $\mu$ g/ml) kontrol ve tedavi gruplarında ise sırasıyla 0.35-0.37  $\mu$ g/ml azlık saptandı. İstatistiksel olarak bu farklılık p  $\leq$ 0.07 düzeyinde anlamlı değişim olarak yorumlandı.  $\alpha$ -tokoferol düzeylerinde kontrol, tedavi öncesi ve sonrası grupta (5.25-6.91-5.45  $\mu$ g/ml) farklı değerler bulundu. Tedavi öncesi grup iki gruba göre p  $\leq$ 0.05 düzeyinde önemi yüksek olarak saptandı. SOD değerlerinde ise kontrollerde 60.41 U/ml'lik düzey, kanserli bireylerde tedavi öncesinde 72.60 U/ml'ye yükselirken, tedavi sonrasında ise 63.74 U/ml'ye düştü.



**Tablo 1.** Sağlıklı bireyler ile mide kanserli hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası bazı mineral madde düzeyleri  
**Table 1.** Levels of some mineral substances before and after gastric cancer treatment with healthy individuals

Parametre	n	Kontrol X ± SEM	n	Tedavi Öncesi X ± SEM	n	Tedavi sonrası	P
Magnezyum (mg/L)	31	17.28 ± 1.56	46	17.37 ± 1.61	21	15.78 ± 1.70	p ≤0.001
Demir (mg/L)	31	1.14 ± 0.87	28	0.82 ± 0.94	16	1.51 ± 2.09	
Çinko (mg/L)	31	0.80 ± 0.08	46	0.91 ± 0.65	13	0.88 ± 0.52	
Bakır (mg/L)	31	1.41 ± 0.32	46	1.57 ± 0.47	18	1.43 ± 0.29	
Kadmiyum (mg/L)	10	0.02 ± 0.01	31	0.02 ± 0.01	2	0.03 ± 0.013	
Kurşun (mg/L)	31	0.32 ± 0.12	38	0.31 ± 0.16	15	0.21 ± 0.14	p ≤0.05
Kalsiyum (%mg)	31	8.86 ± 2.41	46	7.20 ± 1.66	20	8.40 ± 0.98	p ≤0.01
Kobalt (mg/L)	30	0.19 ± 0.07	45	0.21 ± 0.10	17	0.17 ± 0.07	

**Tablo 2.** Sağlıklı bireyler ile mide kanserli hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası bazı vitamin ve antioksidant düzeyleri  
**Table 2.** Levels of some vitamins and antioxidants before and after treatment in healthy individuals and gastric cancer patients

Parametre	n	Kontrol X ± SEM	n	Tedavi Öncesi X ± SEM	n	Tedavi sonrası	p
Seruloplazmin (%mg)	20	67.06 ± 3.41	47	37.91 ± 2.23	16	37.19 ± 3.81	p ≤0.0001
GSH-Px (U/l)	30	4654.57 ± 1798.59	48	4483.20 ± 665.18	18	4407.89 ± 596.29	
SOD (U / ml)	29	60.41 ± 6.37	45	72.60 ± 5.12	19	63.74 ± 7.87	
Retinol Asetat (µg/ml)	20	0.35 ± 0.19	46	0.50 ± 0.35	21	0.37 ± 0.20	p ≤0.07
α - Tokoferol (µg/ml)	20	5.25 ± 1.45	46	6.91 ± 3.33	23	5.45 ± 2.33	p ≤0.05

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Gelişmekte olan ülkelerde görünme oranı azalsa da mide kanseri (Czetzot ve ark. 2005) ve her yıl 500,000 kadının ölümüne sebep olması nedeniyle meme kanseri önemli hastalıklardır (Huang ve ark. 1999). Polonya ise dünyanın en fazla mide kanserine rastlanılan ülkesidir (Lissowska ve ark. 2004). Birçok klinik ve epidemiyolojik çalışmada serbest radikallerin kanser etiolojisinde önemli olduğu gösterilmiştir. Serbest radikal tutucu vitaminlerin (C, E) hayvansal modellerde kanser oluşumunu engelleyici

olduğu gösterilmiştir (Ames 1983; Willett ve MacMahon 1984). İnsanlarda kansere karşı kimyasal koruyucu olarak değerlendirilebilir. Serbest radikallerin (SER) diğer radikal toplayıcıları veya inhibitörleri ise, neoplastik işlemleri geciktirici olarak tanımlanabilir (Kensler ve ark. 1983; Perchellet 1989; Salim 1992).

Lissowsko ve ark. (2004) Polonya'nın dünyada mide kanserinin en yüksek olduğu ülkelerden biri olduğuna dikkati çekerek nedenlerini araştırmışlar, işlenmiş et ürünlerinin, konserve gıdaların fazlaca kullanımının, taze sebze ve meyve tüketiminin etkili olduğunu ön bilgi olarak vermişlerdir. Araştırmacılar, Varşova'da 1994-1996 yılları

arasında erken teşhis koyulan mide kanserliler üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. 274 hasta ve 463 kontrol üzerindeki direkt inceleme ve anket sonucunda; yüksek oranda meyva, koyu yeşil-sarı sebze tüketimi, Vit-C, E,  $\alpha$  ve  $\beta$  karoten alınmasında kansere yakalanma riskinin azaldığı, yüksek düzeyde turşu ve salamura edilen sebze ve sucuk tüketiminde kanserin önemli derecede artmadığını bildirmişlerdir. Fazla ekmek, mısır gevreği, pirinç, makarna, işlenmiş tahıl ve yüksek karbonhidrat indeksi ile beslenmenin kanserle pozitif ilişkili olduğu, sebze meyvenin riski azalttığı, yüksek karbonhidratın kanser riskini arttırdığı ama bunun daha iyi analiz edilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır.

Wu ve ark. (2002) bir vitamin E türevi olan  $\alpha$ -tokoferil succinatın (VES), DNA sentezini durdurup, apoptosisi uyararak mide kanser hücresinin büyümesini engellediğini doku kültürü çalışmaları ile göstermiştir. VES' in insan mide karsinogenezisini durdurmak için iyi bir kemotropik madde olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Li ve ark. (2005) ise benzer bir denemeyle  $\alpha$ -tokoferil succinatın (VES) apoptozisi uyararak 5-10-20 mg/ml dozlarının kanserli hücrelere doku kültürü ortamında 48 saat süre ile verilmesi halinde 10-20 mg/ml dozlarının kanseri engelleyerek normal DNA sarmallarının görülmesini arttırdığını, apoptozisi uyarıcı etki yaptığını bulmuşlardır.

Rumi ve ark. (2001) 40 sağlıklı, 21 mide kanseri olmak üzere 98 farklı kanserli hastada serum Vitamin-A, lutein, zeaksantin  $\alpha$  ve  $\beta$  karoten düzeylerini ölçmüşlerdir. Kontrolde Vitamin-A düzeyi 2,07 mmol/L iken gastrointestinal tümörlerde 0,77 mmol/L düzeyine inmiş ( $r < 0,001$ ), diğer karotinoidlerde değişme saptanmış ve zeaksantin düzeyi 0,143 den 0,042 mmol/L'ye düşmüştür. Serum kolesterol, total protein, albumin, hemoglobin düzeyinde ise önemli değişim saptanmamıştır. Karotinoidleri besinsel faktör olarak farklı kanser tiplerinin gelişmesinden sorumlu tutulurken, sadece Vitamin-A'nın pozitif etkisinin olmadığını vurgulanmıştır.

Mozsik ve ark. (2005) Macaristanda 8 özofagus, 21 mide, 15 karaciğer, 10 pankreas ve 53 kolorektal kanserde (70 erkek, 37 bayan) ve 57 sağlıklı bireyde serum retinoid düzeylerini incelemişlerdir. Mide kanserlerinde Vitamin-A,  $\alpha$ - $\beta$  karoten düzeylerini sırasıyla 1,2-3,85-8,01  $\mu$ mol/L, kontrollerde 2,07-3,95-8,59  $\mu$ mol/L olarak tespit etmişlerdir. Vitamin-A bütün kanser türlerinde azalırken, pankreas kanserinde normal düzeyde bulunmuştur.  $\alpha$  ve  $\beta$  karoten düzeyleri ise yine normal düzeyde saptanmıştır. Zeaksantin düzeylerinde azalma görülürken  $\alpha$ - $\beta$  kriptoksantinde önemli değişim olmamıştır. Beno ve ark. (2000) uzun süre yeterli düzeyde meyve ve sebze alınmasının mide ve kolorektal kanser riskini önemli düzeyde azalttığını bildirmişlerdir. Vit-A, C, E,  $\beta$  karoten ve Se, Cu, Zn düzeylerini ölçerek vitamin ve  $\beta$  karotenlerin kanserlilerde önemli olarak azaldığını, Se'un da azalmasının, Cu düzeyinde artışın gözlemlendiğini, sonuçta ise prekanseröjen lezyonlarda kimyasal korunmanın önemli olduğunu belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (1990) 600 gastrik prekanseröjen lezyonlu kişide serum  $\beta$  karoten, retinol, askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, Se, ferritin, Cu, Zn düzeylerini ölçmüşler,  $\beta$  karoten ve Vit-C'nin önemli olarak azaldığını, düşük ferritinde intestinal metaplazinin arttığını, temel besin maddelerinin azlığında gastrik karsinogenez riskinin arttığını vurgulamışlardır. Aynı araştırmacılar, prekanseröjen mide lezyonları ile serum mikro besinleri ( Vit-A,  $\beta$  karoten, Vit-C, E, Se, Zn, Cu, Fe) arasındaki ilgiyi araştırmışlar, serum  $\beta$  karoten, vit-C, ferritin ile serum Zn/Cu oranının gastrik mukoz membranın patolojik değişimleri ile zıt etkili olduğunu, Vit-C,  $\beta$  karoten artışının metaplazileri azalttığını bildirmişlerdir.

Kobayashi (1990) mide kanserine sahip insanlarda kanserli ve normal doku iz elementleri ve kan Cu, Zn, Mn, Se, Fe düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmasında kanserli doku ile normal doku arasında Cu düzeyini benzer bulurken, tüm kan ve plazma Cu düzeyini hastalığın 4. evresinde 1. evreye göre yükselmiş olarak bulmuştur. Zn doku düzeyi kanserli ve normal doku arasında istatistiksel olarak önemsiz bildirilirken, kanserli dokuda Se düzeyi normallere göre çok yükselmiştir. Plazma Se düzeyi III. evrede I.evreye göre düşmüş, kanserli doku Fe düzeyi normallere göre azalmış, plazma Fe düzeyi kanserlilerde azalmış olarak yine aynı bilim adamı tarafından bildirilmiştir. Mc Millian ve ark. (2000) 12 adet aynı yaş, cinsiyet ve BMI 'e sahip gastrointestinal kanserli insanda yaptıkları çalışmada bazı vitamin ve antioksidantların yanı sıra dolaşımdaki Zn, Cu, Fe ve Se düzeylerini ölçerek kanserde yangıya paralel olarak seruloplazmin ve Cu hariç diğer elementlerde düşüklük tesbit etmişlerdir. Ayrıca İbuprofen (antiinflamatuvar) uygulanmasını takiben Fe, Se düzeyinde az bir artış, seruloplazminde ise düşüş saptamışlardır ( $p \leq 0,05$ ). Sonuç olarak gastrointestinal kanserlilerde dolaşımdaki element düzeyinin düzenlenmesinde yangının magnitude'nin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılmasında ise tedavi sonrası grupta serum yetersizliği nedeniyle ancak 2 numunede analiz yapılabildiğinden sadece kontrol ve kanserli grup değerleri yorumlandı. Ortalama kadmiyum düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ( $p \geq 0,05$ ). Serum kurşun düzeyinde ise kontrol ve kanserli grupta benzer değerler (0,32-0,31 mg/L) saptanırken kemoterapi alan grupta 0,21 mg/L ye düşüş saptanmış olup, bu farklılık  $p \leq 0,05$  düzeyinde önem göstermiştir. Serum Ca düzeyi incelenen tüm gruplarda %8,86-7,20-8,40 mg olarak bulunmuştur. Tedavi öncesi gruptaki düşüş  $p \leq 0,01$  düzeyinde önemli olarak hesaplanmıştır. Serum Co seviyeleri 0,19-0,21-0,17 mg/L olarak ölçülmüş ve gruplar arasında önemli bir farklılık saptanmazken kemoterapi alan grupla kanserlilere göre 0,04 mg/L'lik azalma hesaplanmıştır. Nourie ve ark. (2004) deneysel ve gözlemsel işlemler sonucunda Se noksanlığı saptanan nüfusta üst gastro intestinal kanser (GİK) oluşumunun azaltılması için yüksek serum Se düzeyinin olumlu etki yaptığını bulmuşlardır. 300 hastada serum Se düzeyini 82-155 mg/L olarak saptayarak Ardabil şehri civarlarında GİK ile Se arasındaki önemli ilişki vurgulanmıştır.

Ağır metal toksisitesine karşı, Vit-A, E, C,  $\alpha$  lipoik asit, glutatyon, laktoferrin, Se, Zn, oksidatif streten vücudu koruyan, kuvvetlendiren, kelatlanmayı, detoksifikasyonu arttıran, uyarıcı maddeler olarak değerlendirilir. Vitamin-C, uzun zamandan beri kalp hastalarına ve bazı kanserlere karşı koruyucu, immun fonksiyonu geliştirici, yara iyileştirici, sağlıklı deri ve damar oluşumunu destekleyici, allerjik reaksiyonları azaltıcı görevinin yanı sıra inhalasyon yoluyla alınan ağır metallerden koruyucu rolü vardır. Ayrıca Pb, Al, Cu, Si ve radyasyonun zararlı etkilerini azaltır (Cai ve ark. 2001). Reddy ve ark. (2002) Hindistan'da Andhr Tıp Fakültesine gelen mide ve böbrek kanserinde doku element düzeylerini araştırmışlardır. Mide kanserindeki değerleri Fe 2408-684, Zn 818-229, Cu 63,5-21,2, Pb 8,8-8,1, Ca 647-455, Co 19,4-15,6 mg/gr olarak saptarken Cd düzeyleri tayin düzeyinin altında olarak ölçmüşlerdir. Araştırmacılar Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, düzeylerini normallere göre düşük, Cr, Ni, As, Br'u ise kanserli dokuda yüksek olarak saptamışlardır. Bununla birlikte, mide kanserli kişilerde aklorhidriye rastlanılma sıklığı fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek fosfatlı diyetlerde demir emiliminin erimeyen demir fosfatlı

kompleksler oluşmasına bağlı olarak azaldığı bildirilirken, mide kanserinde mide sıvısında yukarıdaki mekanizmaya bağlı olarak asit fosfataz aktivitesinde artışa işaret etmişlerdir. Azalmış doku Fe düzeyi mide kanseri başlangıcına işaret etmezken, mideden demirin düşük seviyede emilimi HCl asit yokluğuna dayanabilir ve bu midenin karsinojenik tabiata döndüğüne sinyal sayılabilir.

Polonya'da mide kanseri dokusunda Mg düzeyleri normal sağlıklı bireylerinki ile karşılaştırılmış, serum Mg düzeyleri ölçülmüştür. Mg düzeylerinin kanserli dokuda yüksek olduğunu, yalnız serum Mg düzeylerinin kanserlilerde normale yakın düzeylerde dalgalandığını bildirmişlerdir. Doku-Mg düzeyinin hastalığın ilerlemesi ile artış gösterdiğini vurgulamışlardır (Pasternak ve ark. 1999).

Japonya'da mide kanserliler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada kan Mg ve Ca düzeyleri saptanmış (Tazawa ve ark. 1990) plazma ve tüm kanda yüksek Mg düzeyleri ile düşük Ca düzeyleri ölçülmüştür. Malignantlık ve metastaz ile tüm kan Ca ve tüm kan ve plazma Mg düzeyleri arasındaki ilişki vurgulanmıştır. Serum Cu ve seruloplazmin düzeyleri, ilerlemiş mide kanserli 35 bireyde ölçülmüş olup, Cu düzeyi kanserli ve ilerlemiş durumlarda artış gösterirken, polikemoterapik ilaçlardan sonraki remisyon döneminde azalmıştır. Seruloplazminin ise hastalığın klinik değerlendirmesiyle ilgili olduğu, hastalığın diağnoz ve prognozunda Cu ve seruloplazminin önemli olduğu vurgulanmıştır (Scanni ve ark. 1979).

Memeli hücreleri Cu/Zn SOD ve Mn-SOD ye sahiptir. Mn-SOD mitokondriada bulunur ve ROS lara karşı olarak bilinir ve oksidatif hasara karşı en önemli koruma rolü oynadığına inanılır. 7000 dalton molekül ağırlığına sahip sülfidridlen zengin bir protein olan metallothionein (MT) iz metal homeostazisinde, metal toksisitesine karşı korumada ve OH<sup>-</sup> radikallerini toplamada görev yapar. MnSOD ve MT oksidatif stresle artar, mide kanseri oluşmasında MnSOD ve MT uyarılmasının kaybolduğu Lee ve ark. (2003) tarafından bildirilmiştir. Gastrointestinal sistem özellikle reaktif oksijen türlerinin atağı neticesinde kanser oluşumuna kadar giden bir dizi patolojik olaya hassastır. 18 normal, 18 özofagus kanserli, 18 mide kanserli ve 62 kolorektal kanserli insanlarda yapılan doku çalışmalarında (Skrzydewska ve ark. 2003) SOD, GSH-Px, Glutasyon redüktaz, MDA, CAT, Glutasyon düzeyleri incelenmiş olup, özofagus tümörlerinde tüm enzim aktiviterinde artış, mide kanserinde SOD, MDA, düzeylerinde artış, GSH-Px, Glutasyon redüktaz aktiviterinde azalış, kolorektal kanserlerinde ise CAT hariç hepsinde artış saptanmıştır. Bütün kanserlerde glutasyon düzeyi yükselirken MDA düzeyleri düşmüştür. Tümör türlerindeki bu antioksidant düzeylerindeki dengesizlik ROS etkisini arttırmakta, lipid peroksidasyonunu genişletmekte ve kanser oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Skrzydewska ve ark. 2003). Mide kanserlerinde oksidatif hasar ve kanser ilişkisinin incelendiği bir diğer çalışmada SOD, CAT, GSH-Px, MDA düzeyleri saptanmıştır. SOD ve CAT aktiviterinde önemli düşme bulunurken, GSH-Px de önemli değişme saptanamamıştır. MDA ise önemli düzeyde yükselmiştir. Artan MDA, azalan antioksidant enzim düzeylerinin mide kanseri riskini işaret edebilecek parametreler olarak yorumlanabileceğine dikkat çekilmektedir (Batcioglu ve ark. 2006). Mide ülseri ve mide kanserinde oluşumu başlatan ve ilerlemesine yardımcı olan etkenlerin başında oksidatif stresin olduğu yönünde yapılan deneysel çalışmalarda sıçanlarda soğuk stresi ile oluşturulan ülserde mide mukozasında lipid peroksidasyonunun ve SOD aktivitesinin arttığı, ülserli ve mide kanserli hastalarda ise LPO da artışa, SOD aktivitesinde ise düşüşü

rastlanıldığı, mide ülseri ve kanseri ile serbest radikallerce uyarılan oksidatif stres arasında pozitif korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır (Glover 1990). Kim ve ark. (2003) SOD'un mide kanseri hücrelerindeki biyolojik öneminin belirgin olmadığını ifade ederek, SOD'un prognostik öneminin klinikopatolojik faktörlerle ilişkisini araştırmışlardır. MnSOD'in ekspresyonun ilerlemiş mide kanserine sahip hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğuna, Cu/ZnSOD ekspresyonu ile hastanın yaşayabilmesi arasında bağlantı olmadığına işaret etmişlerdir. MnSOD immuno reaktivitesinin mide kanserinde kötü prognozla önemli ilişkisi vurgulanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile tıp doktorlarının mide kanserini biyokimyasal değerlendirmesi ve ilaç uygulamalarının faydalarını klinik olarak değerlendirmesi için önemli laboratuvar bulguları sunuldu. Mide kanserine sahip hastalarda detaylı olarak mineral, vitamin ve antioksidant madde analizleri yapıldı. Kontrol grubu ile tedavi öncesi mide kanserli bireylerin tüm değerleri karşılaştırıldığında değişimler tesbit edildi. Serum Mg seviyesinde p<0.001önemli azalma tesbit edildi. Serum Ca p<0.01, Pb p<0.05 düzeyinde düşme saptanırken tedavi sonrasında antioksidant maddelerde özellikle seruloplazmin değerinde kontrollere göre düşme gözlemlendi. Bu ciddi azalma istatistiksek olarak çok önemli hesaplandı (p<0.0001). GSH- Px düzeyinde saptanan azalma tedavi sonrasında da bulundu. SOD aktivitesinde kanserli olanlarda yükselme saptanırken retinol asetat p<0.07 ve α-tokoferol p<0.05 düzeylerinde yine artış tesbit edildi.

## KAYNAKLAR

- Akkuş İ (1995).** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Allum WH, Hallissey MT, Kelly KA (1989).** Adjuvant chemotherapy in operable gastric cancer. 5 year follow-up of first British Gastric Cancer Group trial. *Lancet*, 18, 571-574.
- Ames BN (1983).** Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1264.
- Anonymous (1997).** Glutathione Peroxidase Enzim Kiti, Randox Lab. Ltd., U.K.
- Anonymous(2005).** <http://216.109.117.135search/cache?p=gastric+cancer+antioxidants+heavy+metals>
- Aruama OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991).** Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 273, 601-604.
- Batcioglu K, Mehmet N, Ozturk IC, Yilmaz M, Aydogdu N, Erguvan R, Uyumlu B, Beno I, Klvanova J, Magalova T, Brtkova A (2000).** Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. *Neoplasma*, 47 (1),37-40.
- Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, Van De Velde CJH (1999).** Extended Lymph-node Dissection for Gastric Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 340 (12), 908-914.
- Cai L, Cherian MG, Cherian MG (2001).** Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. *Chemico-Biological Interactions*, 137, 75-88.
- Chen J, Geissler C, Parpia B, Li J, Campbell TC (1992).** Antioxidant status and cancer mortality in China. *Int J Epidemiol*, 21 (4), 625-635.
- Czetzot H, Scibior D, Skrzycki M, Podsiad M (2005).** Antioxidant barrier in patients with gastric cancer-preliminary study. *Pol Merkuriusz Lek*, Volume 19 (112),521-525.
- Douglass HO, Nava HR (1985).** Gastric adenocarcinoma-management of the primary disease. *Semin onkol*, 12, 32.
- Dündar Y, Aslan R (2000).** Hekimlikte Antioksidant Stres ve Antioksidantlar, Afyon Kocatepe Üniv. 29, 4-5.
- Falchuk KH (1977).** Effect of acute disease and ACTH on serum zinc proteins. *N Engl J Med*, 296, 1129.
- Flohe L and Gunzler WA (1984).** Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114-115.
- Glover J (1990).** Free Radical Biology: A paradox in cancer research. *J. Natl. Cancer Inst*, 82, 11, 902-903.
- Hoffman ME, Meneghini R (1979).** Action of hydrogen peroxide on human fibroblasts in culture. *Photochem Photobiol*, 30, 151-155.

- Huang YL, Sheu JY, Lin TH (1999).** Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry*, 32 (2), 131-136.
- Jacobs EJ, Connell CJ, McCullough ML, Chao A, Jonas CR, Rodriguez C, Calle EE and Thun MJ (2002).** Vitamin C, vitamin E, and multivitamin supplement use and gastric cancer mortality in the cancer prevention study II cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, 35-41.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlioğlu M, Başpınar N, Tiftik AM (2000).** *Biyokimya*, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şt, Ankara.
- Kensler TW, Bush DM, Kozumbo WJ (1983).** Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. *Science*, 221, 75-77.
- Kim JJ, Chae Sw, Hur GC, Cho SJ, Kim MK, Choi J, Nam SY, Kim WH, Yang HK, Lee BL (2003).** Manganese superoxide dismutase expression correlates with a poor prognosis in gastric cancer. *Pathobiology*, 70 (6), 353-360.
- Kobayashi M (1990).** Studies on trace elements in cancerous gastric tissue of the patients with gastric cancer. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 65 (3), 320-335.
- Le Chevalier T, Smith FP, Harter WK, et al (1985).** Chemotherapy and combined modality therapy for locally advanced and metastatic gastric carcinoma. *Semin Onkol*, 12, 46.
- Lee TB, Lim DY, Jeon HJ (2003).** Differential induction of Mn-containing superoxide dismutase by paraquat in peripheral lymphocytes of normal subjects and gastric cancer patients. *Molecules and Cells*, 16 (1), 13-18.
- Leonhardt W, Hanefeld M, Müller G, Hora C, Meissner D, Lattke P, Paetzold A, Jaross W, Schroeder HE (1996).** Impact of concentrations of glycosylated hemoglobin,  $\alpha$ -tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low density lipoproteins in patients with Type I Diabetes, Type II Diabetes and control subject. *Clinica Chimica Acta*, 254, 173-186.
- Li HW, Zhao L, Wu K (2005).** Effective molecular form of alpha-tocopheryl succinate in inducing apoptosis of SGC-7901 cells. *Wei Sheng Yan Jiu*, 34 (2), 149-151.
- Lissowska J, Gail MH, Pee D, Groves FD, Sobin LH, Nasierowska-Gutmajer A, Sygnowska E, Zatonski W, Blot WJ, Chow WH (2004).** Diet and stomach cancer risk in Warsaw. *Nutr. Cancer*, 48 (2), 149-159.
- Mayer RJ, Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci A, Root RK (1991).** Neoplasms of the esophagus and gastric. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* 12 th ed. S 1248-1251. Mc Graw-Hill, New York.
- McMillian DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly DS, McArdle CS (2000).** Changes in micronutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer. *Nutrition*, 16(6), 425-428.
- Menteş NK (1982).** Mide kanseri. *Klinik Gastroenteroloji*. 4. Baskı. S 242-254. Sanem Matbaacılık.
- Mert N, Bildik A, Ertekin A, Dede S (1999).** *Biyokimya*, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Yayını, Van.
- Miller KW, Yang CS (1985).** An Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analysis of Plasma Retinol,  $\alpha$ -tocopherol and Various Carotenoids. *Analytical Biochemistry*, 145, 21-26.
- Morton S, Roberts DJ (1993).** University of Bristol Unicam AAS Methods, Manual Issue 2 (05/93)
- Mozsik G, Rumi G, Dömötör A, Figler M, Gasztonyi B, Papp E, Par A, Par G, Belagyi J, Matus Z, Melegh B (2005).** Involvement of serum retinoids and Leiden mutation in patients with esophageal, gastric, liver, pancreatic, and colorectal cancer in Hungary. *World J Gastroenterol*, 11(48), 7646-7650.
- Nomura A, Stemmemann G, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1991).** Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*, 325 (16), 1132-1136.
- Nourie M, Pourshams A, Kamangar F, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Akbari MR, Fakheri H, Zahedi MJ, Caldwell K, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R, Dawsey SM (2004).** Ecologic study of serum selenium and upper gastrointestinal cancer in Iran. *World J Gastroenterol*, 10 (17), 2544-2566.
- O'Connell MJ (1992).** Etoposide, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy for advanced gastric cancer: An old lesson revisited. *J Clin Oncol*, 10, 515-516.
- Örmeci N, Aktan H (1988).** Midenin malign tümörleri. *Gastroenteroloji*. 1. Baskı, 103-109. Makro Yayıncılık. Ankara.
- Paglia DE and Valentine WN (1967).** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*, 70 (1), 158-168.
- Parshad R, Sanford KK (1971).** Oxygen supply and stability of chromosomes in mouse embryo cells in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 47, 1033-1035.
- Pasternak K, Przystlak W (1999).** Magnesium in gastric cancer. *Magnes. Res*, Vo12 (2), 139-43.
- Perchellet JP, Perchellet EM (1989).** Antioxidant and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Free Radical Biol Med*, 7, 377-408.
- Reddy SB, Charles MJ, Kumar MR, Reddy BS, Ch. Anjaneyulu, Raju GJN, Sundareswar B and Vijayan V (2002).** Trace elemental analysis of adenoma and carcinoma thyroid by PIXE method. *Nucl. Instr. And Meth. B*, Volume 196, 333-339.
- Rumi G Jr, Matus Z, Toth G, Par A, Nagy Z, Vincze A, Rumi G, Mozsik G (2001).** Changes of serum carotenoids in patients with esophageal, gastric, hepatocellular, pancreatic and colorectal cancer. *Physiol Paris*, 95 (1-6), 239-242.
- Salim AS (1992).** Removing oxygen-derived free radicals delays hepatic metastases and prolong survival in colonic cancer: a study in the rat. *Onkology*, 49, 58-62.
- Scanni A, Tomirotti M, Licciardello L, Annibali E, Biraghi M, Trovato M, Fittipaldi M, Adamoli P, Curtarelli G (1979).** Variations in serum copper and ceruloplasmin levels in advanced gastrointestinal cancer treated with polychemotherapy. *Tumori*, 65 (3), 331-8.
- Skrzydłewska E, Kozusko B, Sulowska M, Bogdan Z, Kozłowski M, Snarska J, Puchalski Z, Sulkowski S, Skrzydłowski Z (2003).** Antioxidant potential in esophageal, gastric and colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 50 (49), 126-131.
- Stähelin HB, Gey KF, Eichholzer M, Lüdin E, Bernasconi F, Thurneysen J, Brubacher G (1991).** Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-years follow-up of the prospective Basel Study. *Am J Epidemiol*, 133(8), 766-775.
- Sürücüoğlu MS (1992).** Kardiyovasküler hastalıklarda mineral ve iz elementlerin önemi. *Beslenme ve diyet dergisi*, 21(1), 71-82.
- Tazawa T, Itoh T, Kobayashi M, Saito K (1990).** Changes in blood magnesium and calcium concentrations in patients with gastric cancer. *Magnes Res.*, 3(4), 275-281.
- Weitzman SA, Weitberg AB, Clarck EP, Stossel TP (1985).** Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science*, 227(4691), 1231-1233.
- Willett WC, MacMahon B (1984).** Diet and cancer, an overview (second of two parts). *N Engl J Med*, 310(11), 697-703.
- Wils J (1996).** The Treatment of Advanced Gastric Cancer. *Semin Onkol*, 23(3), 397-406.
- Winawer SJ, Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC (1992).** Neoplasms of the gastric. *Cecil Textbook of Medicine*, 19 th ed. S 667-671.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004).** Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Bio.*, 14(6), 473-86
- Wu K, Zhao Y, Liu BH, Li Y, Liu F, Guo J, Yu WP (2002).** RRR-alpha-tocopheryl succinate inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. *World J Gastroenterol*, 8 (1), 26-30.
- Wu Q, Chen YQ, Chen ZM, Chen F, Su WJ (2002).** Effects of retinoic acid on metastasis and its related proteins in gastric cancer cells in vivo and in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 23(9), 835-841.
- Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR and Richardson A (1995).** Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J. Nutr*, 125(2), 195-201.
- Yaylalı B, Sözer V (1995).** İnsan Hastalıklarında Eser Elementler. *Endokrinolojide Yönelişler*, 4 (1), 25-33
- Yenson M (1986).** *Klinik Biyokimya Laboratuvarı Ders Kitabı*, Beta Basım Yayın Ltd. Şti. İstanbul.
- Zaspel BJ, Csallany AS (1983).** Determination of Alpha-Tocopherol in Tissues and Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 130(1), 146-150.
- Zhang L, Zhao L, Ma J (1995).** Relationship between serum micronutrients and precancerous gastric lesion. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 29(4), 198-201.
- Zhang XM, Ellis EF (1990).** Superoxide dismutase reduces permeability and induced by hypertension in rats. *Am. J. Physiol*, 259(2), 479-503.





## 360 degree Veterinary Dermatology; Topical *Curcuma longa* with *Nigella sativa* Combination Against Alopecia Treatment for Cats and Dogs

Kerem URAL Hasan ERDOĞAN Serdar PAŞA Songül ERDOĞAN

Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Disease, Aydın, Turkey

Received: 10.06.2019

Accepted: 19.07.2019

### ABSTRACT

Alopecia, as primary skin lesion causes dermatocosmetical problems for animals and their owners. It should not be unwise to draw suggestion that newer molecular agents, probably phytotherapeutical compound should have helped treatment. In the present article the researchers identified case series of natural alopecia model in 3 cats and 3 dogs, to those of which gave satisfactory respond to topical *Curcuma longa* with *Nigella sativa* combination in 8 to 12 days, almost with complete hair regrowth.

**Keywords:** Topical, *Curcuma longa*, *Nigella sativa*, Alopecia, Cat, Dog

### ÖZ

## 360 derece Veteriner Dermatoloji; Kedi ve Köpeklerde Alopesi Sağaltımında Topikal *Curcuma longa* ile *Nigella sativa* Kombinasyonu

Primer bir deri lezyonu olduğunda alopesi gerek hayvanlar gerekse sahipleri için dermatokozmetik problemlere yol açmaktadır. Yeni moleküler ajanların, muhtemelen fitoterapötik bileşiklerin alopesi sağaltımına yardımcı olacağını söylemek yersiz olmayacaktır. Bu makalede araştırmacılar olgu serisi ile doğal alopesi modelinde 8. ila 12. günler içerisinde topikal *Curcuma longa* ile *Nigella sativa* kombinasyonuna tam olarak kılların çıkışı ile cevap veren 3 kedi ile 3 köpeği tanımlamaktadırlar.

**Anahtar Kelimeler:** Topikal, *Curcuma longa*, *Nigella sativa*, Alopesi, Kedi, Köpek

### GİRİŞ

Alopesi ile seyreden dermatolojik bozukluklar kedi ve köpeklerde gerek kozmetik kusur gerekse sağlık problemi şeklinde veteriner kliniklerinde karşımıza çıkmaktadır (Ural 2014). Dermatolojik muayenede ana unsurları oluşturan anamnez bilgileri ve laboratuvar muayeneleri sonucu tanıya gidilemediği durumlarda gerek hastalıklara bağlı, gerekse traş sonrası alopesi ve tüylerin uzamaması hasta sahibi nezdinde estetik kusur olarak değerlendirilmekte, derinin eski halini alması ve kıllarda tam uzama çoğunlukla aylar, yıllar alabilmektedir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde alopesiye yönelik yeni hızlı moleküler ajanlara, muhtemelen de fitoterapiye ihtiyaç duyulabilmektedir.

Orta Doğu ve Asya kültürlerinde oldukça uzun müddettir baharat olarak kullanılan zerdeçal, *Zingiberaceae* (Ginger ailesi) genusunda yer alan *Curcuma longa* adlı bitkinin rizomlarından şekillenen turmerik'in aktif etken maddesidir (Gonzalez ve Sethi 2012). *Curcumin* (diferuloylmetan), polifenol karakterde ve anti-inflamatuvar, antioksidan, antiproliferatif ve yara iyileştirici özelliktedir (Anand ve ark. 2007; Thangapazham ve ark. 2007). *Nigella sativa* (*N. sativa*) botanik *Ranunculaceae* ailesine mensup orta Avrupa, Orta

Doğu ve Batı Asya'da sıklıkla yetiştirilen ve tüketilen bir bitkidir. Ülkemizde de yetiştirilen *N. sativa* ya da halk arasında bilinen adıyla çörek otu/karacaotu, İbn-i Sina'nın "El Kanun fit-Tıp" adlı başyapıtında metabolizmayı uyarıcı, halsizlik-uyuşukluk giderici özellikleriyle vurgulanmış, günümüzde farklı ve çok sayıda bilimsel çalışma ile analjezik ve antihistaminik aktiviteleri ispatlanmıştır (Al-Jabre ve ark. 2015). Tüm dünyada gerek Tıp alanında gerekse Veteriner Hekimlik alanında gerçekleştirilen çalışmalarda araştırmacılar bahis konusu olan her 2 baharata da yoğun ilgi göstermekte, sağaltımda rollerinin belirlenerek potansiyel moleküler hedeflere yönelik araştırmalara yer vermektedir. Biz de bu olgu sunumları ile anılan her 2 bileşenin alopesi sağaltımındaki rolünü belirlemeyi amaçladık.

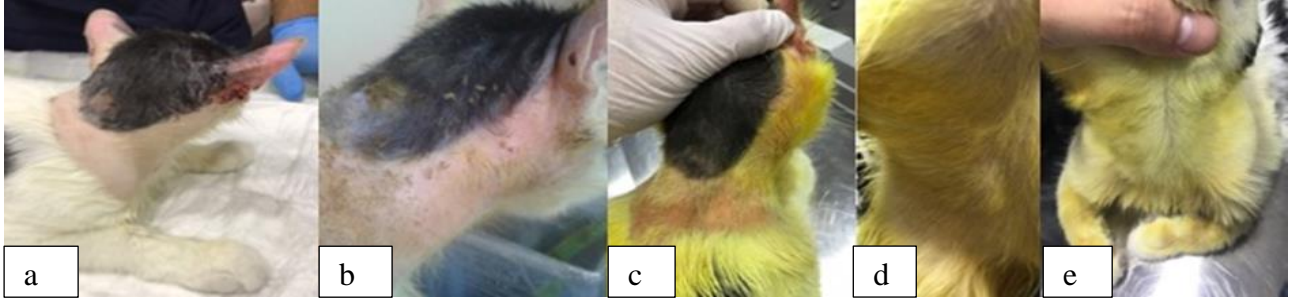
### OLGU SUNUMU

Çalışma kapsamına Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ana Bilim Dalında muayene edilen 3 köpek (2-5 yaşlı; 2 erkek ve 1 dişi), Özel Veteriner Kliniklerine getirilen 3 kedi (1.5-3 yaşlı, 2 erkek ve 1 dişi) değerlendirilmeye alındı. Ortak anamnezde alopesi, kaşıntısız dermatoz tespit edildi. Parazitolojik, mikrobiyolojik, hematolojik, endokrinolojik ve



dermatolojik muayeneler sonrası ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulması muhtemel hastalıklar ekarte edildikten sonra Polycheck in vitro alerji testleri (RDA grup, Atateknik, Tıb. Mlz. Paz. Tek. Serv Hiz. İstanbul, Türkiye) ile hipersensitivite tanısı konulan 3 köpekte (Ev tozu akarları - *D. farinae* ve *D. pteronyssinus* ve Depo akarı - *Acarus siro*) ve 2 kedide (kuzukulağı ve *Ctenocephalides sp.*) farklı alerjenlere karşı Ig E oluşumu belirlendi. Bir olguda serum numunesi elde edilemediğinden test gerçekleştirilemedi. Her 6 olguda da eş zamanlı %4'lük *C.*

*longa* (%95 saflıkta) ile *N. sativa* (%80 saflıkta) ekstratlarını içeren Noe-Vet V.H.M. Dermacumin kremi lokal olarak alopesik lezyonlar üzerine günde 2'şer kez lezyonu geçecek şekilde taşkın olarak uygulandı. Uygulama sonrası klinik muayeneye eşlik ettirilen olgulara ait farklı günlerdeki görünüm Şekil 1-5 'de gösterildi. Her 6 olguda da 8.-12. günler arasında net ve belirgin bir tüy artışı ile sonuçlanan klinik iyileşme sağlandı.



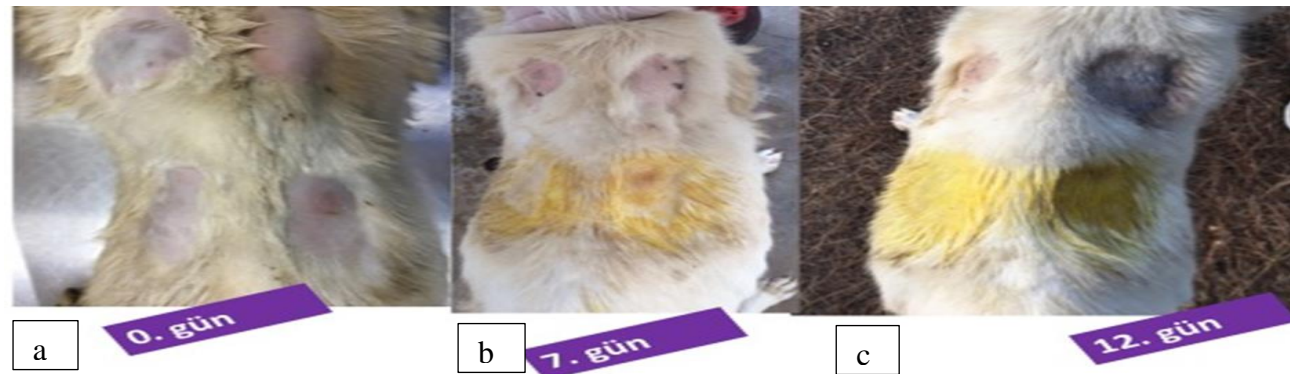
**Şekil 1.** Hipersensitivite belirlenen ve gıda alerjisi mevcut olmayan 1.5 yaşlı melez kedide sırasıyla a) sağaltım öncesi, b) topikal *C. longa* ve *N. sativa* krem sağaltımı esnasında 2. gün ve c) 6. günde tüylerde belirgin ve yaklaşık olarak %60'lara varan uzama, d) ve e) 8. gün sırasıyla yandan ve önden fotoğrafik görünüme eşlik eden %100 uzama

**Figure 1.** 1.5 years old crossbred cat with hypersensitivity and non-food allergy, respectively a) prior to treatment, b) topical *C. longa* and *N. sativa* cream therapy day 2, c) day 6 approximately 60% hair regrowth d) and e) day 8, respectively from lateral and front view appearance accompanied by 100% hair regrowth



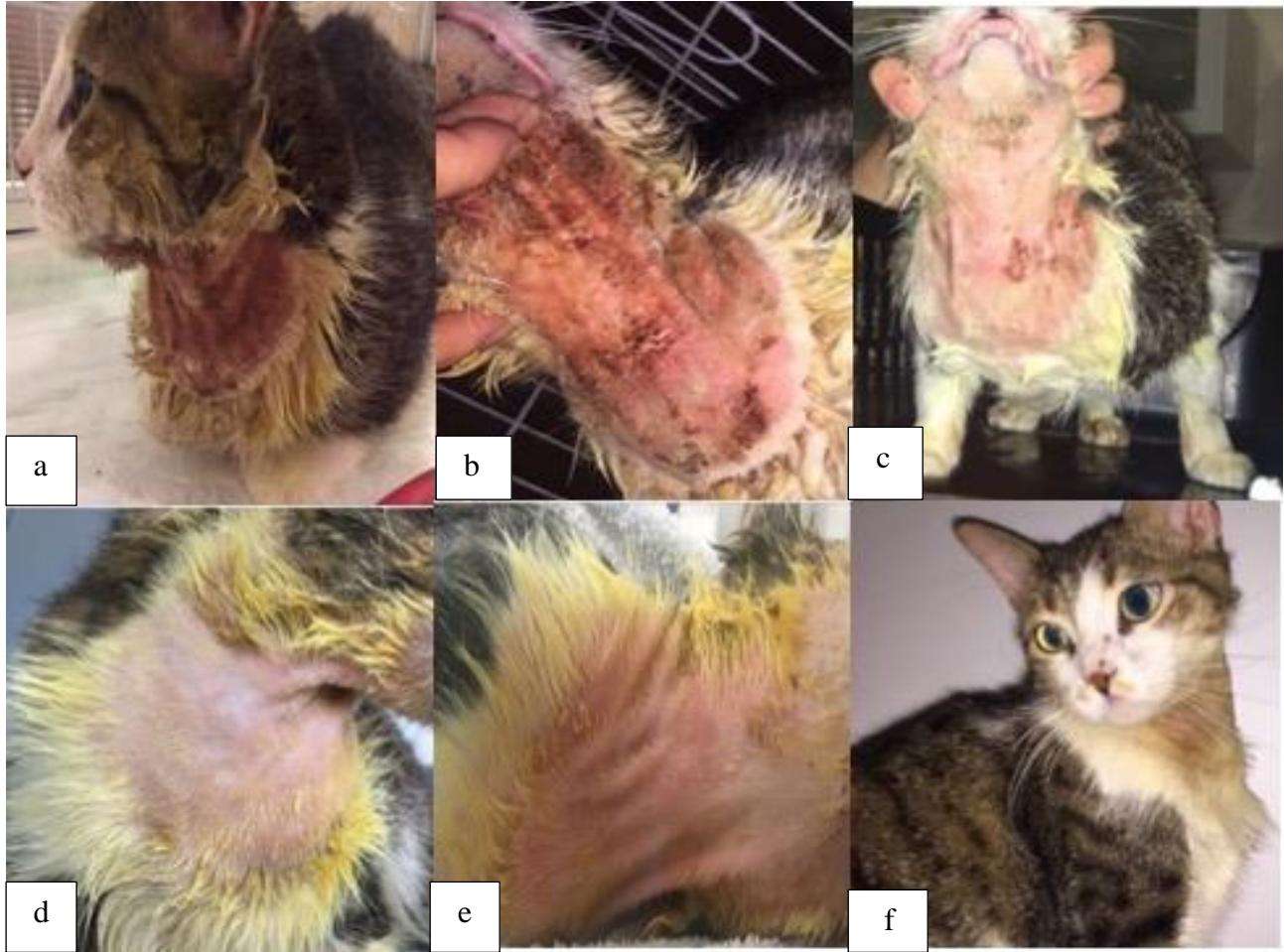
**Şekil 2.** Traş sonrası doğal alopesi modelinde 2 yaşlı melez köpekte sırasıyla a) sağaltım öncesi, b)topikal *C. longa* ve *N. sativa* krem sağaltımı esnasında 5. gün ve c) 8. günde tüylerde belirgin ve yaklaşık olarak %100'lere varan uzama

**Figure 2.** Post clipping natural alopecia model, a 2 years old crossbred dog respectively a) prior to treatment, b) day 5 at topical *C. longa* and *N. sativa* cream therapy and c) day 8 significant hair regrowth nearly 100%



**Şekil 3.** Traş sonrası doğal alopesi modelinde 3 yaşlı melez köpekte ön taraftaki 2 lezyondan sol taraftakine 1 defaya mahsus subkutan melatonin implantı, sağ taraftakine melatonin implantı artı d vitamini injeksiyonu, sol arka lezyona topikal *C. longa*, sağ arka lezyona *C. longa* ve *N. sativa* krem sağaltımı sırasıyla a) sağaltım öncesi, b) krem sağaltımı esnasında 7. gün ve c) 12. günde tüylerde belirgin ve yaklaşık olarak %90'lara varan uzama

**Figure 3.** Post clipping natural alopecia in 3 years old crossbred dog with front lesions, received subcutaneous melatonin implant to the left one, melatonin implant plus vitamin d injection to the right one, whereas left back lesion were subjected to topical *C. longa*, right back lesion within *C. longa* and *N. sativa* treatment a) prior to treatment b) during cream treatment at day 7 and c) day 12 significant and nearly 90% hair regrowth



**Şekil 4.** Baş ve boyun bölgesi dermatitisi bulunan kedide sırasıyla a) ve b) sağaltım öncesi, *C. longa* ve *N. sativa* krem sağaltımı sonrası c) 4. gün, d) 6. gün e) 8. gün ve f) 11. gün belirgin klinik iyileşme

**Figure 4.** Feline head and neck dermatitis, respectively a) and b) prior to treatment, after *C. longa* and *N. sativa* cream treatment c) day 4, d) day 6 e) day 8 and f) day 11 significant recovery



**Şekil 5.** Dört yaşlı köpekte traş sonrası doğal alopesi modelinde a) sağaltım öncesi ile *C. longa* ve *N. sativa* krem sağaltımı sonrası b) 72. saatte belirgin tüy çıkışı ve c) 10. günde %100'e varan belirgin tüylenme.

**Figure 5.** A 4 years old dog with natural alopecia model postclipping a) prior to treatment with *C. longa* and *N. sativa* treatment b) 72. Hours significant hair regrowth and c) 10. days nearly 100% hair regrowth.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda 3'er köpek ve kedide *N. sativa* ile *C. longa* ekstratlarının kombinasyonu ile sağlanan iyileşme, alopesinin giderilmesi ve tüylerde %90'a varan çıkış *N. sativa*'nın antibakteriyel (Rafati ve ark. 2014),

antiparaziter (Mohamed ve ark. 2005; Bafghi ve ark. 2011), anti-inflamatuvar (Houghton ve ark. 1995) ya da hipersensitivite reaksiyonların karşı etkinliği (El Gazzar ve ark. 2006; Yousefi ve ark. 2013) ile açıklanabilir. Dermatolojik sağaltımda rolü (Gonzalez ve Sethi 2012; Nguyen ve Friedman 2013) olduğu belirlenen *C. longa*'nın topikal uygulamalarda yine antibakteriyel ve

antiinflamatuvar aktivite gösterdiği (Skenderi 2003), androjenetik alopeside yıkılanmış kılların vellus benzeri görünümüne sahip iyi kıllarla yer değiştirdiği (Pumthong ve ark. 2012) bildirimleri dikkate alındığında çalışmamızdaki 6 olguda da iyileşmeden sorumlu olabilir. Anılan olguların dışında *N. sativa* ile *C. longa* ekstratlarının kombinasyonu ile ilgili çalışmalarımız süregelmekte, Veteriner Dermatoloji alanına yönelik, özellikle de alopesi sağaltımına dair umut vaat edici gelişmeler gerek Aydın gerekse büyük şehirler olan Ankara, İstanbul'da tarafımızca kaydedilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Al-Jabre SHM, Al-Akloby OM, Randhawa MA (2015).** Dermatological effects of *Nigella sativa*. J Dermatol & Dermatol Surg, 19(2), 92-98.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007).** Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm, 4,807-818.
- Bafghi AF, Vahidi AR, Anvari MH, Barzegar K, Ghafourzadeh M (2011).** The in vivo antileishmanial activity of alcoholic extract from *Nigella sativa* seeds. Afr J Microbiol Res, 5(12), 1504-1510.
- El Gazzar MA, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC (2006).** Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. Int Immunopharmacol, 6,1135-1142.
- Gonzalez T, Sethi A. (2012).** Curcumin (turmeric) and its evolving role in skin health, Handbook of diet, nutrition and the skin, Wageningen Academic Publishers.; pp. 332-348.
- Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR (1995).** Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta Med, 61(1),33-36.
- Mohamed AM, Metwally NM, Mahmoud SS (2005).** *Nigella sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. Mem Inst Oswaldo Cruz 100(2), 205-211.
- Nguyen TA, Friedman AJ (2013).** Curcumin: a novel treatment for skin-related disorders. J Drugs Dermatol. 12(10), 1131-1137.
- Pumthong G, Asawanonda P, Varothai S ve ark (2012).** Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 alpha-reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Dermatolog Treat, 23(5), 385-392.
- Rafati S, Niakan M, Naseri M (2014).** Anti-microbial effect of *Nigella sativa* seed extract against staphylococcal skin infection. Med. J Islam Repub Iran, 8(28),42.
- Skenderi G (2003).** Herbal Vade Mecum, Herbacy Press, Rutherford, NJ, 2003.
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK (2007).** Beneficial role of curcumin in skin diseases. Adv Exp Med Biol, 595, 343-357.
- Ural K (2014).** Köpeklerde Paraziter Dermatozlar; Veteriner İç Hastalıklarında Olgulardan Edindiğimiz Dersler, Ural K. (Edt), Uzerler Matbaası, Ankara, 112.
- Yousefi M, Barikbin B, Kamalinejad M, Abolhasani E, Ebadi A, Younespour S, Manouchehrian M, Hejazi S (2013).** Comparison of therapeutic effect of topical *Nigella* with Betamethasone and Eucerin in hand eczema. J Eur Acad Dermatol, 27,1498-1504.





## A Case of Peromelia, Meromelia and Adactyly in A Calf

İsmail ALKAN<sup>1</sup> Tunahan SANCAK<sup>1</sup> Yeter DEĞER<sup>2</sup> Yağmur KUŞCU<sup>1</sup> Loğman ASLAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Van, Turkey

<sup>2</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

Received: 07.01.2019

Accepted: 23.06.2019

### ABSTRACT

An 11 days old female calf constitutes the material of this case report. In patient's history, some information was obtained that calf was artificial insemination offspring, had normal birth and 3. calf of its mother. After clinical and radiographic evaluation, it diagnosed as peromelia in right extremite, and meromelia and adactyly in left extremite, and hiperflexion in both elbow joint. Decubitus wound due to the hiperflexion was cleaned and wet dressing with antibacterial agent was applied. Antibiotic was applied for possible seconder infections caused by wound. It has been suggested that dressings should be regularly refurbished, that the conditions of care be improved and that attention to feeding.

**Keywords:** Peromelia, Meromelia, Adactyly, Calf, Anomaly

### ÖZ

### Bir Buzağıda Peromelia, Meromelia ve Adaktili Olgusu

Bu olgu sunumunu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi kliniğine getirilen Holştayn ırkı bir ineğin 11 günlük dişi buzağısı oluşturdu. Anamnezde; annenin suni tohumlama ile gebe kaldığı, 3. doğumunun olduğu ve doğumun normal olarak gerçekleştirildiği bilgisi alındı. Yapılan klinik ve radyografik muayeneler sonucunda sağ ve sol dirsek eklemide hiperfleksiyon ve sağ ekstremitede peromelia, sol ekstremitede meromelia ve adaktili teşhisi konulan buzağının dirsek (cubiti) eklemlerinde hiperfleksiyona bağlı olarak oluşmuş dekübitis yaraları temizlendi ve yara antiseptikli yaş pansumana alındı. Yaralara bağlı olarak şekillenebilecek enfeksiyonlara karşı parenteral antibiyotik verildi. Pansumanların düzenli olarak yenilenmesi, bakım şartlarının iyileştirilmesi ve beslenmesine dikkat edilmesi önerildi.

**Anahtar Kelimeler:** Peromelia, Meromelia, Adaktili, Buzağı, Anomali

### GİRİŞ

Hayvanlarda ve insanlarda, doğumdan hemen sonra görülen ve kalıtsal olduğuna inanılan, embriyonel veya fetal dönemde gelişen anomaliler, organ ve sistemlerde yapısal ya da fonksiyonel bozukluklara yol açarak hayvan yetiştiriciliğini tehdit eden önemli problemler olarak kabul edilirler (Alkan ve ark. 2001; Özak ve ark. 2009).

Kongenital anomaliler multiple olabilir veya tek bir organı etkileyebilir. Multiple kongenital anomaliler vücudun bir bölgesinde gelişir ve başka bir bölgesinde de benzer semptomlara sebep olur (Özmen 2015). Bu anomalilere çoğunlukla kas-iskelet, sindirim ve merkezi sinir sisteminde, az olarak da ürogenital sistem, göz ve deride rastlanılmaktadır (Demiraslan ve ark. 2014). Sığırlarda birçok anomalinin genetik faktörler (transgenler, kromozomlar), çevresel ajanlar (enfeksiyon, toksinler, fertilizasyon teknikleri) veya bu faktörlerin kombinasyonu ile ilişkili olduğu, bunların yanında gebeliğin erken dönemlerinde amniyon kesesine yapılan travmatik etkilere bağlı olarak da ortaya çıktığı bildirilmiştir (Aslanbey ve ark. 1988; Alkan ve ark. 1994;

Newman ve ark. 1999; Demiraslan ve ark. 2014).

Kongenital anomalili yavrular anne karnında ölmekte, ölü doğmakta ya da doğduktan bir süre sonra ölmektedir. Anomalili doğup yaşamlarına devam edenler ise bakım-beslenmelerinin problemleri olması veya hayvan sahiplerinin hayvana acıma duygularından dolayı bir süre sonra zorunlu olarak kesime sevk edilmektedir (Alkan ve ark. 1997).

Ekstremitelerde görülen anomalilerden, ekstremitenin distal kısımlarının yokluğuna peromelia, ekstremitenin bir bölümünün olmamasına meromelia ve parmakların olmamasına ise adaktili denir (Alkan ve ark. 1997; Özenc 2014; Chawla ve Poonam 2014; Gupta ve Kumar 2014; Nayak ve ark. 2016).

### OLGU SUNUMU

Bu sunumda materyali Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen, Holştayn ırkı bir ineğin 11 günlük dişi buzağısı oluşturdu. Anamnezde; ineğin suni tohumlamayla gebe kaldığı, gebelik süresinde herhangi bir ilaç uygulanmadığı,

rektal muayene yapılmadığı, ineğin 3. doğumunun olduğu ve doğumun normal şekilde gerçekleştiği öğrenildi (Şekil 1).



**Şekil 1.** Buzağının görüntüsü

**Figure 1.** Image of the calf

Klinik muayenede; iki ön ekstremitede dirsek ekleminde büküklük belirlendi. Hiperfleksiyon pozisyonunda bulunan bu eklemler pasif hareketler ile ekstensiyon pozisyonuna getirilemedi. Humerusun distali ile radiusun proksimali arasında sabitlenmiş şekilde kaynaşmayı andırır bir sertlik olduğu ve tam ankiloz şekillendiği tespit edildi. İki dirsek ekleminde doku kayıplı yaralarla birlikte sağ ön ekstremitede de kısıtlı varlığı gözlemlendi (Şekil 2).

Klinik muayene esnasında buzağının dışkılama ve idrar yapmada herhangi bir problem yaşamadığı belirlendi.

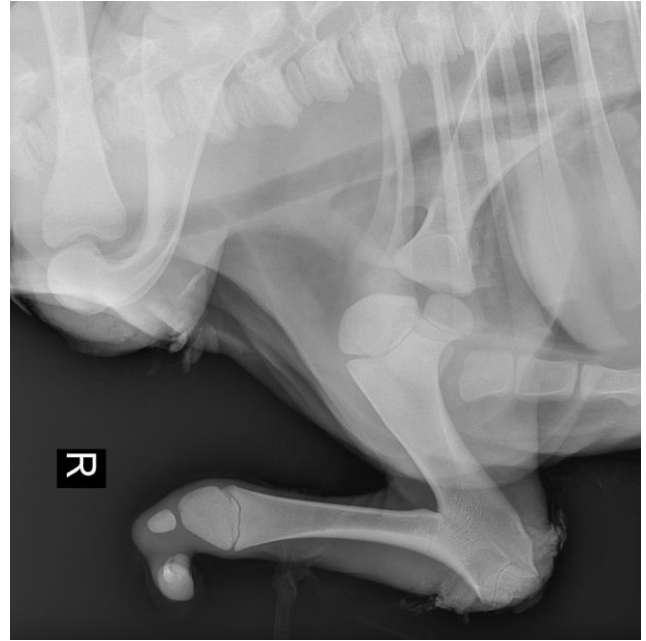


**Şekil 2.** Dirsek ekleminde oluşan açık yaralar

**Figure 2.** Open wounds in elbow joint

Radyografik muayenede; sağ ekstremitede scapula, humerus ve radius kemiklerinin bulunduğu fakat ulnanın bulunmadığı ayrıca radiustan sonra carpal ekleminde iki adet küçük kemik kalıntısının bulunduğu ve bacağın burada sonlandığı gözlemlendi (peromelia). Ayrıca klinik muayenede şüphelenildiği üzere humerusun distal 1/3'ü ile radiusun proksimal 1/3'lük kısmında symphysis şeklinde bir eklemlenme görüldü. (Şekil 3).

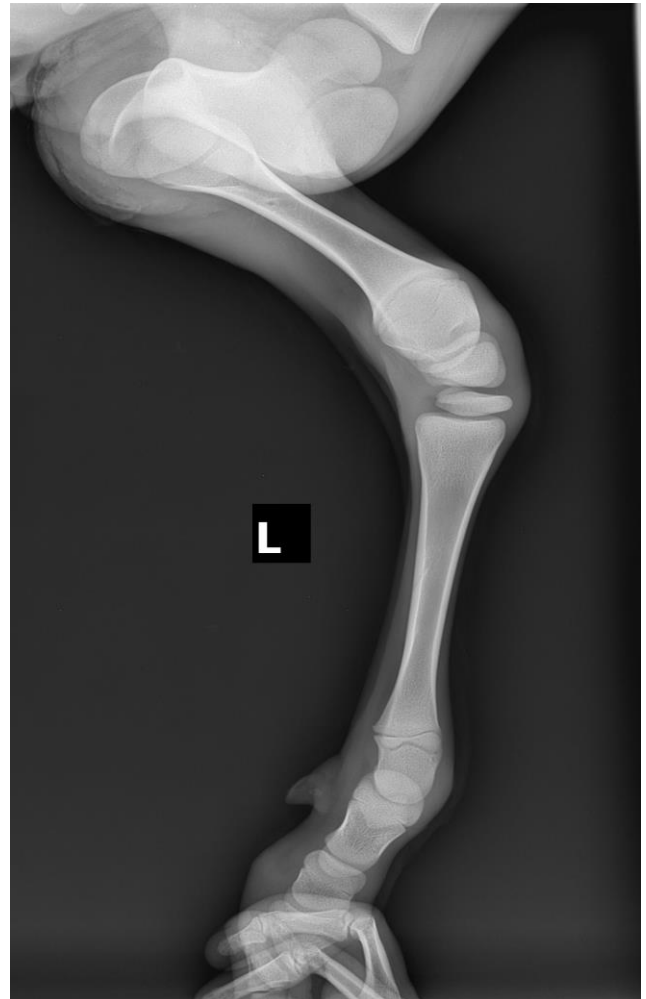
Sol ekstremitede ise scapula, humerus ve radius kemiklerinin şekillendiği, ulnanın şekillenmediği, carpal kemiklerin eksik şekillendiği ve medial metacarpusun şekillenmediği (meromelia) belirlendi.



**Şekil 3.** Sağ ekstremitenin M/L radyografisi

**Figure 3.** M/L radiography of right extremity

Ayrıca ayakta sadece lateral parmağın şekillendiği, medial parmağın şekillenmediği (adaktili) tespit edildi (Şekil 4).



**Şekil 4.** Sol ekstremitenin M/L radyografisi

**Figure 4.** M/L radiography of left extremity

Laboratuvar analizleri için kan alındı. Alınan kan örneklerinde biyokimyasal parametreler normal sınırlar

arasında olup, hematolojik parametrelerdeki PLT, WBC, GRAN ve MID değerlerinin yüksek olması enfeksiyon varlığını gösterdi (Tablo 1, 2).

Buzağının dirsek eklemesindeki yaralar %0.1'lik ethacridin lactat ile temizlendikten sonra aynı solüsyon ile yaş

pansumana alındı (Şekil 5). Buzağı için geniş spektrumlu antibiyotik verildi. Hasta sahibine, pansumanların düzenli olarak yenilenmesi, bakım şartlarının iyileştirilmesi ve beslenmesine dikkat edilmesi önerildi.

**Tablo 1.** Biyokimyasal parametreler

**Table 1.** Biochemical parameters

Analiz (Assay)	Birim (Unit)	Referans Değerleri		Sonuç (Result)	Uyarı Etiketi (Flags)
		(Ranges)			
AlbG	g/dL			2.0	
<b>AlkP</b>	<b>U/L</b>	<b>40-150</b>		<b>166</b>	<b>Yüksek</b>
ALT	U/L	0-55		11	
Amy	U/L	25-125		48	
<b>AST</b>	<b>U/L</b>	<b>5-34</b>		<b>45</b>	<b>Yüksek</b>
B12 II	pg/mL			108	
BilD	mg/dL	0-0.5		0.15	
BiliT	mg/dL	0.2-1.2		0.27	
<b>CaC</b>	<b>mg/dL</b>	<b>8.4-10.2</b>		<b>11</b>	<b>Yüksek</b>
Chol	mg/dL	0-199		59	
CK	U/L	29-200		175	
<b>CKMB</b>	<b>U/L</b>	<b>0-24</b>		<b>154</b>	<b>Yüksek</b>
CL-C	mmol/L	98-107		97	Düşük
CreaC	mg/dL			0.94	
GGT	U/L	9-64		44	
GluC	mg/dL	70-99		86	
<b>K-C</b>	<b>mmol/L</b>	<b>3.5-5.1</b>		<b>5.2</b>	<b>Yüksek</b>
<b>LDH</b>	<b>U/L</b>	<b>125-220</b>		<b>858</b>	<b>Yüksek</b>
LDL	mg/dL			20	
MAG	mg/dL			1.91	
Na-C	mmol/L	136-145		139	
<b>Phos</b>	<b>mg/dL</b>	<b>2.3-4.7</b>		<b>8.4</b>	<b>Yüksek</b>
TP	g/dL	6.4-8.3		6.5	
Trig	mg/dL	0-149		17	
UA	mg/dL	2.6-7.2		4.2	
UHDL	mg/dL	40-60		36	Düşük
Urea	mg/dL	7-26		26	
<b>VitD_25OH</b>	<b>ng/mL</b>			<b>50.2</b>	



**Tablo 2.** Hematolojik parametreler**Table 2.** Hematologic parameters

Analiz (Assay)		Referans Değerleri (Ranges)	Sonuç (Result)	Uyarı Etiketi (Flags)
<b>RBC</b>	<b>10<sup>12</sup> / 1</b>	<b>3.5-5.5</b>	<b>7.77</b>	<b>Yüksek</b>
MCV	fL	75-100	39.2	Düşük
<b>RDW%</b>	<b>%</b>	<b>11-16</b>	<b>22.1</b>	<b>Yüksek</b>
RDW <sub>a</sub>	fL	30-150	28.8	Düşük
HCT	%	35-55	30.4	Düşük
<b>PLT</b>	<b>10<sup>9</sup> / 1</b>	<b>100-400</b>	<b>775</b>	<b>Yüksek</b>
MPV	fL	8-11	6.7	Düşük
PDW	fL	0.1-99.9	8.8	
PCT	%	0.01-9.99	0.52	
LPCR	%	0.1-99.9	12.1	
<b>WBC</b>	<b>10<sup>9</sup> / 1</b>	<b>3.5-10</b>	<b>13.6</b>	<b>Yüksek</b>
HGB	g/dL	11.5-16.5	11.1	Düşük
MCH	pg	25-35	14.3	Düşük
MCHC	g/dL	31-38	36.5	
LYM	10 <sup>9</sup> / 1	0.5-5	2.4	
<b>GRAN</b>	<b>10<sup>9</sup> / 1</b>	<b>1.2-8</b>	<b>8.9</b>	<b>Yüksek</b>
<b>MID</b>	<b>10<sup>9</sup> / 1</b>	<b>0.1-1.5</b>	<b>2.3</b>	<b>Yüksek</b>
LYM%	%	15-50	17.6	
GRA%	%	35-80	65.1	
<b>MID</b>	<b>%</b>	<b>2-15</b>	<b>17.3</b>	<b>Yüksek</b>

**Şekil 5.** Pansumanın görüntüsü**Figure 5.** Image of dressing

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Kongenital anomaliler multiple olabilir ya da organların tek bir parçasını etkileyebilir. (Özmen 2015). Anomaliler çoğunlukla kas-iskelet, sindirim ve merkezi sinir sistemi başta olmak üzere, az olarak da ürogenital sistem, göz ve deride meydana gelmektedir (Demiraslan ve ark. 2014). Bu olgunun klinik ve radyografik kontrolünde, anomalinin iskelet sistemi kaynaklı olduğu anlaşılmıştır.

Peromelia'da, bir veya daha fazla ekstremitede distal kısımların (metacarpus/metatarsus ve falanks kısımlarının) yokluğu gözlenir (Alkan ve ark. 1997; Özenç 2014; Nayak ve ark. 2016). Bu olguda klinik ve radyografik muayene de sağ ön bacakta scapula, humerus, radius kemiklerinin bulunduğu fakat ulnanın bulunmadığı ayrıca radiustan sonra iki adet küçük kemik kalıntısının bulunması ve bacağın burada sonlanması sonucu peromelia tanısı konulmuştur.

Meromelia ekstremitenin kısmi yokluğuna, adaktili ise parmakların olmamasına verilen isimdir (Chawla ve Poonam 2014; Gupta ve Kumar 2014, Nayak ve ark. 2016).

Bu olguda radyografik muayenede sol ekstremitede scapula, humerus ve radius kemiklerinin şekillendiği,

ulnanın şekillenmediği, carpal kemiklerin eksik şekillendiği ve medial metacarpusun şekillenmediği (meromelia), ayrıca ayakta sadece lateral parmağın şekillendiği, medial parmağın şekillenmediği tespit edildiği için adaktili tanısı konulmuştur.

Doğmasal anomalilerin nedenleri genetik faktörler (transgenler, kromozomlar), çevresel ajanlar (enfeksiyon, toksinler, fertilizasyon teknikleri) ve bu faktörlerin kombinasyonu ile ilişkilidir. Gebeliğin erken dönemlerinde rektal muayene sırasında amniyon kesesine yapılan travmatik etkilere bağlı olarak da ortaya çıktığı bildirilmiştir (Aslanbey ve ark. 1988; Alkan ve ark. 1994; Newman ve ark. 1999; Demiraslan ve ark. 2014). Ancak bu olguda, gebelik esnasında herhangi bir rektal muayene yapılmadığı belirtilmiştir. Fakat hayvanın suni tohumlamayla gebe kalması vakanın suni tohumlama sırasındaki mikrotravmalara bağlı olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak peromelia, meromelia ve adaktili'li bu olguda fonksiyonel ve yapısal kusurlar; anamnez, klinik ve radyolojik bulgularla ortaya konulmuştur. Diğer taraftan peromelia, meromelia ve adaktili olgularının bir olguda nadir görülmesi nedeniyle veteriner hekimlere duyurulmasına karar verilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Alkan F, Tuzcu M, Koç Y, Oğurtan Z (1997).** Bir buzağıda ectrodactyly ile birlikte şekillenmiş micromelia. *Vet Bil Derg*, 13,2: 129-131.
- Alkan F, Koç Y, Beşoluk K, Karaman M (2001).** Bir buzağıda gözlenen notomelie olgusu. *Vet Bil Derg*, 17,4: 103-108.
- Alkan İ, Gürkan M, Gül Y, Gençcelep M (1994).** Akkaraman kuzuda rastlanan unilaterale polimelie ve hemimelie olgusu. *YYÜ Vet Fak Derg*, 5 (1-2): 11-16.
- Aslanbey D, Taşbaş M, Olcay B (1988).** İki ikiz oğlakta rastlanan bilateral radial paraxial hemimelie olgularına ait gözlemler. *AÜ Vet Fak Derg*, 35 (1): 93-103.
- Chawla D, Marwah P (2014).** Meromelia in a newborn- a rare congenital anomaly. *Indian J Pediatr*, 81 (12): 1422.
- Demiraslan Y, Aslan K, Gürbüz İ, Özen H (2014).** Simental bir buzağıda görülen çoklu konjenital anomaliler. *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, 20 (4): 629-632.
- Gupta P, Kumar A (2014).** Amelia-Meromelia Sequence with Atrial Septal Defect – A Rare Occurrence. *Fetal and Pediatric Pathology*, 33: 92 – 97.
- Nayak S, Khatua M, Suren Prasad D (2016).** Congenital amputation of limbs: meromelia. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 15 (6): 106-108.
- Newman SJ, Bailey TL, Jones JC, DiGrassie WA, Whittier WD (1999).** Multiple congenital anomalies in a calf. *J Vet Diagn Invest*, 11, 368-371.
- Özak A, Nisbet HÖ, Yardımcı C (2009).** İki buzağıda karşılaşılan polimelie olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 305-307.
- Özenç E (2014).** Bir buzağının tüm ekstremitelerinde gözlemlenen peromelia olgusu. *Kocatepe Vet J*, 7 (2): 57-59.
- Özmen Ö (2015).** A case of monobrachial peromelia in two years old hostein cow. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 323-326.



# VAN VETERINARY JOURNAL



## Article Copyright Transfer Agreement Form

We, the undersigned researchers, certify that; the article we have sent; is original, wasn't sent to or disapproved of potential publication by any other journal, wasn't initially published, and we bear the responsibility concerning the Scientific content and Ethical values related to the article, and transfer any kind and form of copyright related to the Article to Van Veterinary Journal since it is published in the journal, and accept that we will not make any changes wholly or partly in the article and chose ..... as the authorized researcher.

**Title of the article:**

.....  
.....  
.....

Authors Name	Date	Signature
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		

### Authorized Researcher

Title, Name-Surname : .....

Full Address : .....

e- mail : .....

Tel, Fax : .....

Date and Signature : .....



# VAN VETERINARY JOURNAL



## Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is Van Vet J.
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication.
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://vanvetderg.org> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures and graphs; original papers and reviews should not exceed 15 pages and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 1000 words. Summary should include **Aim, Material and Method, Results and Conclusion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system.
- 9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.
- 10- **Copyright Transfer Agreement Form** which automatically sends to the authors by the submission system after acceptance of the Paper should be signed and posted to the Editorial Office of the journal.
- 11- Apart from tables and graphs all visual elements (Photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **figure**. Tables and graphs are named as it is.
- 12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish and English** in the text.
- 13- Original research articles should be lined up as; **English Heading, Author(s) name, author(s) address, Summary and key words** and then **Turkish heading, summary and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgement or information** (if there is) and **References**.
- 14- References should be listed according to authors surname alphabetically. In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the [Web of Science](#). For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:  
**Articles:**  
**Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015).** Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.  
**Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015).** Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989  
**Books:**  
**Marrow DA (1986).** Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.  
**Books chapters:**  
**Bahk J, Marth EH (1990).** Listeriosis and Listeria monocytogenes. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.  
**Electronic Material:** The name of the article and available web address and access date should be written.  
**Who (2006).** Avian Influenza, February 2006, [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/) Access date: 10 January 2009.
- 15- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>).
- 16- Information about the publication expenses for accepted papers will be given to the author(s) after determining cost.
- 17- Copyright fee will not be paid to the author(s).

**Correspondence:** Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

Yuzuncu Yil Universitesi, Veteriner Fakultesi, Dergi Editorlugu, 65080-Kampus/Van/TURKEY  
e-mail: [vfd@yyu.edu.tr](mailto:vfd@yyu.edu.tr) Phone: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 432 225 11 27