

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi



SBE

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK/DECEMBER 2019
CİLT/VOLUME 7
SAYI/ISSUE 2

Mehmet Akif Ersoy University
Journal of Health Sciences Institute

E-ISSN: 2148-2837

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ
Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute

Sahibi / Owner

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi adına Rektör
(On behalf of Mehmet Akif Ersoy University)

Prof. Dr. Adem KORKMAZ

Editör / Editor in Chief

Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU

Editör Yardımcıları / Assoc. Editors

Doç. Dr. Erhan KEYVAN

Dr. Öğr. Üyesi Hıdır GÜMÜŞ

Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI

Yayın Türü / Publication Type

Yerel Süreli Yayın / Local Periodical Publication

Kapak-Dizgi / Cover -Design

Doç. Dr. Erhan KEYVAN

Mizanpaj / Layout

Dr. Öğr. Üyesi Emine Hilal ŞENER

Yayın Kurulu Sekreteri / Secretary of Editorial Board

Dr. Öğr. Üyesi Canan DEMİR BARUTÇU

İletişim Adresi / Correspondence Address: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi Sekreterliği 15030 - BURDUR

Telefon: +90 248 2133181 **Faks:** +90 248 2133190 **E-posta:** sagbild@mehmetakif.edu.tr

Web Adresi: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/maeusabed/>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi yılda 3 sayı olarak yayımlanır (Aralık-2019 itibarıyla). Dergi, DOAJ, Google Scholar, SciLib, Researchbib, SOBIAD, Türkiye Atf Dizini gibi ulusal ve uluslararası indeksler tarafından taranmaktadır.

Yayın Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Calogero STELLETTA

University of Padua Department of Animal Medicine

Prof. Dr. Mahmut OK

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Prof. Dr. Lenka VORLOVÁ

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology
Department of Milk Hygiene and Technology

Prof. Dr. Ali BUMİN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı

Prof. Dr. M. Bozkurt ATAMAN

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Prof. Dr. Iva STEINHAUSEROVA

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology
Department of Meat Hygiene and Technology

Prof. Dr. Zülfikar Kadir SARITAŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı

Prof. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Prof. Dr. Aynur BAŞALP

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Sağlık Yönetimi Bölümü

Prof. Dr. Hüseyin ERDEM

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Assoc. Prof. Dr. Rosen DIMITROV

Trakia University Faculty of Veterinary Medicine Department of Anatomy

Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Assoc. Prof. Dr. Mihai C. CENARIU

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Animal Reproduction

Doç. Dr. Ali Doğan ÖMÜR

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Dr. Marta STANIEC

University of Life Sciences in Lublin Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Editör Kurulu / Editorial Board

Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU

Doç. Dr. Erhan KEYVAN

Doç. Dr. Ramazan YILDIZ

Dr. Öğr. Üyesi Hıdır GÜMÜŞ

Dr. Öğr. Üyesi Cevat SİPAHİ

Dr. Öğr. Üyesi Şükrü GÜNGÖR

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Menekşe BALKAN

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cumhur AKIN

Dr. Öğr. Üyesi Emine Hilal ŞENER

Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI

Dr. Öğr. Üyesi Hidayet TUTUN

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi

YAZARLARA BİLGİ

I- Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi Genel Bilgiler

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (MAKÜ) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün yayın organıdır. Derginin kısaltılmış adı "MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg" dir. Yılda 2 kez yayınlanır. MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi sağlık bilimleri, (veteriner, tıp, diş hekimliği, hemşirelik ve spor bilimleri) alanlarında temel ve klinik hakemli bilim yazılarının yayımlandığı hakemdenetimli bir dergidir. Derginin dili Türkçe ve İngilizce'dir. Dergiye gönderilen yazıların başka herhangi bir dergide yayınlanmamış, yayına kabul edilmemiş ya da yayınlanmak üzere değerlendirme aşamasında olmaması gerekir. Bu kural bilimsel toplantılarda sunulan ve özeti yayınlanan bildiriler için geçerli değildir. Ancak, bu gibi durumlarda bildirinin sunulduğu toplantının adı, tarihi ve yeri bildirilmelidir. Makalelerin formatı "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/>)" kurallarına göre düzenlenmelidir.

Gönderilen yazılar yayın kuruluna ulaştıktan sonra öncelikle, yazım kurallarına uygunluğu yönünden değerlendirilir; sonucu yazara dört hafta içinde bildirilir. Yazının, gerek teknik özellikleri gerekse genel kapsamı açısından derginin genel yayın ilkelerine uygun bulunmaması durumunda yazı reddedilir. Ya da, gerekirse, yazar(lar)ın yazıyı yazım kurallarına uygun biçimde yeniden göndermeleri istenebilir. Yeniden gönderilen yazılar benzer bir teknik incelemenin ardından yazım kurallarına uygun ise danışman denetimi sürecine alınır. Yazı, editör ve yardımcı editörler ile yazının başlık sayfasını görmeyen en az iki danışmana gönderilerek incelenir. Yazı, yayın kurulunun belirlediği ve bilimsel içerik ve yazım kuralları açısından değerlendirilir. Editör ve yardımcı editörler gerek gördüğünde makaleyi üçüncü bir danışmana gönderebilir. Hakem belirleme yetkisi tamamen editör ve yardımcı editörler ve yayın kuruluna aittir. Danışmanlar belirlenirken derginin uluslararası yayın danışma kurulundan isimler seçilebileceği gibi yazının konusuna göre ihtiyaç duyulduğunda yurt içinden veya yurt dışından bağımsız danışmanlar da belirlenebilir. Daha sonra, danışman raporları dikkate alınarak ve gerekirse yazar(lar)la tekrar iletişim kurularak yayın kurulunca son redaksiyon yapılır. Yazıların kabulüne editör karar verir.

Editör yayın koşullarına uymayan yazıları; düzeltmek üzere yazarına geri gönderme, biçimce düzenleme veya reddetme yetkisine sahiptir. Yazılarını geri çekmek isteyen yazarlar bunu yazılı olarak editöre bildirmek durumundadır. Editör görülen lüzum halinde bazı makaleler hakkında yayın yürütme kurulunun görüşüne başvurur. Bu değerlendirme süreci dergiye gönderilen yazı türlerinden araştırma yazılarını, olgu sunumlarını ve özgün yazıları kapsar. Diğer yazı türlerindeki yazılar doğrudan yayın kurulunca değerlendirilir. Dergiye gönderilen yazılar yayınlansın ya da yayınlanmasın geri gönderilmez. Tüm yazarlar bilimsel katkı ve sorumluluklarını ve çıkar çatışması olmadığını bildiren toplu imza ile yayına katılmalıdır. Araştırmalara yapılan kısmi de olsa nakdi ya da ayni yardımların hangi kurum, kuruluş, ilaç-gereç firmalarınca yapıldığı dip not olarak bildirilmelidir. Dergide yayınlanan yazılar için herhangi bir ücret ya da karşılık ödenmez.

Yayın kurulu yazar(lar)ın dergiye gönderdikleri yazıları değerlendirme süreci tamamlanmadan başka bir dergiye göndermeyeceklerini taahhüt ettiklerini kabul eder. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan deneysel araştırmaların bildirildiği yazıların gereç ve yöntem bölümünde, bu araştırmanın yapıldığı gönüllü ya da hastalara uygulanan işlemler anlatıldıktan sonra kendilerinin onaylarının alındığını (informed consent) gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yazar(lar), bu tür araştırmalarda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara (2002 yılında revize edilen 1975 Helsinki Deklarasyonu- <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>, Guide for the care and use of laboratory animals - www.nap.edu/catalog/5140.html), T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından getirilen, 29 Ocak 1993 tarih ve 21480 sayılı Resmî gazetedeki yayınlanan "İlaç Araştırmaları Hakkında Yönetmelik" ve daha sonra yayınlanan diğer yönetmeliklerde belirtilen hükümlere uyulduğunu belirtmeli ve kurumdan aldıkları Etik Kurul Onayı'nın bir kopyasını göndermelidir. Metin içinde standart kısaltmalar kullanılır, bunlar ilk geçtikleri yerde açık olarak yazılır. İlaç adları kullanımında ilaçların jenerik adları Türkçe okunuşlarıyla yazılır. Ölçüm birimleri metrik sisteme uygun olarak verilir; örneğin, "mg" olarak yazılır, nokta kullanılmaz; ek alırsa (,) ile ayrılır. Laboratuvar ölçümleri Uluslararası Sistem (US; Systéme International: SI) birimleri ile bildirilir.

Bilimsel sorumluluk

Makalelerin tüm bilimsel sorumluluğu yazarlara aittir. Gönderilen makalede belirtilen yazarların çalışmaya belirli bir oranda katkısının olması gereklidir. Yazarların isim sıralaması ortak verilen bir karar olmalıdır. Sorumlu yazar, yazar sıralamasını "Yazar Sorumluluk ve Yayım Hakkı Devir Formu'nu" doldurarak tüm yazarlar adına kabul etmiş sayılır. Yazarların tümünün ismi makale başlığının altındaki bölümde yer almalıdır.

Yayın Ücretleri

Bu dergide yayın tamamen ücretsizdir. Yayın ücreti, başvuru ücreti, makale işleme ücreti ve bir figürün, rakamın veya tamamlayıcı verinin uzunluğuna göre ek ücret ödenmesi gerekmez. İçerik öğeleri (Editörler, Düzeltilmeler, İlaveler, Geri Çekmeler, Mektuplar, Yorumlar vb.) tamamen ücretsizdir.

Etik sorumluluk

Makalelerin etik kurallara uygunluğu yazarların sorumluluğundadır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, çalışma protokolünün çalışmanın yapıldığı kurumdaki hayvan deneyleri etik kurulu tarafından onaylandığı belirtilmelidir. Yazarlar etik kurul onayını makale ile birlikte göndermelidir. Eğer makalede daha önce yayımlanmış alıntı yazı, tablo, resim vs. var ise yazarlar; yayım hakkı sahibi ve yazarlarından yazılı izin alarak bu durumu makalede belirtmek zorundadır. Makalenin değerlendirilmesi aşamasında yayın kurulunun gerek görmesi halinde, makale ile ilgili araştırma verilerinin ve/veya etik kurul onayı belgesinin sunulması yazarlardan talep edilebilir.

İntihal politikası

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi'ne (MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.) Gönderilen yazılar intihal açısından değerlendirilir. Her gönderilen makale, iThenticate ve Turnitin yazılımı ile intihal için kontrol edilir. Makalenin benzerlik oranı %20'nin üzerinde ise, revize edilmesi için ilgili yazara geri gönderilir. Eğer makalenin yayınlanmasından sonra intihal kanıtlanırsa, bu makale derhal web sitesinden kaldırılır ve ilgili yazarlara makalelerinin MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.'de yayınlanmasının uygun olmadığı bildirilecektir.

II- Dergiye Gönderilecek Yazı Türleri ve Özellikleri

a) Araştırma Makaleleri: Bu yazılar daha önce yayınlanmamış özgün araştırma verilerinin değerlendirildiği net anlam taşıyan bilimsel çalışmaları kapsar. Araştırma makaleleri “Öz, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Kaynaklar” bölümlerinden oluşmalıdır. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen araştırma makaleleri kapak sayfası hariç en fazla 20 sayfa olmalıdır. Araştırma makalelerinde kullanılacak tablo, çizim ve resim sayısı toplam 10'u geçmemelidir. Yazarlar gerek duydukları takdirde “Tartışma” bölümünden sonra “Teşekkür” bölümü açarak gerekli açıklamaları yapabilirler.

b) Derleme Makaleleri: Derleme makaleleri dergi editör/yayın kurulu tarafından "çağrılı derlemeler" başlığı altında oluşturulan alında katkı sağlama potansiyeli olan yazıları içerir. Kaynakça bölümü en fazla 30 kaynakçadan oluşturulmalıdır. Derlemelerde kullanılacak tablo, çizim ve resim sayısı toplam 10'u geçmemelidir. Kapak sayfası hariç en fazla 20 sayfa olarak hazırlanmalıdır. Derlemelerde mutlaka “Öz, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar” bölümleri bulunmalıdır.

c) Olgu Sunumları: Yazarların, herhangi planlanmış bir araştırmaya dayanmayan ancak karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. Bu eserlerde gereksiz uzatmaları önlemek amacıyla en fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Kapak sayfası hariç en fazla 5 sayfa olmalı; “Öz, Giriş, Olgu, Tartışma ve Kaynaklar” bölümlerinden oluşmalıdır.

d) Kısa Araştırma Raporu: Dar kapsamlı ele alınmış (sınırlı sayıda örneğin analiz edildiği çalışmalar vb.) ancak önemli ve yeni bilgiler sunan bilimsel araştırmaya dayalı makalelerdir. Kısa bildiriler araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve kapak sayfası hariç en fazla 10 sayfa olmalıdır. Bu eserlerde kullanılacak tablo ve şekil sayısı beşi geçmemelidir.

e) Özel Bölümler:

1. Editöre mektuplar: Dergide yayınlanan yazılara ilişkin değerlendirme ve eleştirileri içeren yazılardır. Mümkün olduğunca eleştirilen yazının yazar(lar)ınca verilen yanıtlar ile birlikte yayınlanır. Editöre mektuplar 3 sayfayı geçemez.

2. Toplantı haberleri/izlenimleri: Derginin yayın alanıyla ilgili konularda yapılmış ya da yapılacak olan bilimsel toplantıları tanıtıcı yazılardır. 1 sayfayı geçemez.

3. Dergi haberleri: Derginin yayın alanıyla ilgili konularda yayınlanmakta olan bilimsel dergileri tanıtıcı yazılardır; 1 sayfayı geçemez.

4. Web siteleri tanıtımı: Derginin yayın alanıyla ilgili konulardaki web sitelerini tanıtıcı yazılardır; 1 sayfayı geçemez.

5. Kitap/tez tanıtımı: Derginin yayın alanıyla ilgili konularda yayınlanmış bulunan kitapları/tezleri tanıtan yazılardır; 3 sayfayı geçemez.

III- Makalelerin Düzenlenmesi

Dergiye gönderilecek yazılar türlerine göre, başlık sayfası, İngilizce ve Türkçe özetler, ana metin, kaynaklar, tablo/şekil/resim bölümlerini içerir. Dergiye yayınlanması için gönderilen makalelerde aşağıdaki biçimsel esaslara uyulmalıdır: Yazı Microsoft Word programında Times New Roman yazı stilinde 12 punto büyüklüğünde, siyah renkte, 1,5 satır aralığında hazırlanmalıdır. Kenarlardan 2,5 cm boşluk bırakılmalıdır. Her

sayfaya satır numarası eklenmelidir.

Anatomik terimler Latince yazıldığı gibi kullanılmalıdır. Günlük tıp diline yerleşmiş terimler ise okundukları gibi Türkçe yazım kurallarına uygun olarak yazılmalıdır. İngilizce veya başka bir yabancı dildeki şekli ile yazılan terimler tırnak içinde belirtilmelidir. Yazının başlık sayfasında, yazının Türkçe ve İngilizce başlığı ve sayfa üstünde kullanılmak üzere boşluklar da dahil 40 karakteri aşmayacak şekilde Türkçe ve İngilizce kısa başlık önerisi bulunmalı. Çalışmaların yapıldığı klinik, anabilim dalı/bilim dalı, enstitü ve kuruluşun adı belirtilmelidir.

a) Başlık Sayfası: Gönderilen makalenin kategorisini, başlığını (Türkçe-İngilizce ve sadece ilk sözcüğün baş harfi büyük), yazarların adlarını (sadece baş harfleri büyük yazılır), çalıştıkları kurumları (rakamla dipnot olarak belirtilmeli), yazışmaların yapılacağı sorumlu yazarın adı, açık adresi, telefon ve faks numaraları ile e-posta adresini içermelidir. Sorumlu yazar yıldız (*) ile belirtilir. Makale daha önce bilimsel bir toplantıda sunulmuş ise toplantının adı, tarihi ve yeri belirtilerek yazılmalıdır.

b) Ana Metin Bölümü: Yazının ana metni Öz ve Anahtar Kelimeler, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Tartışma başlıkları içinde düzenlenir. Özler ve anahtar sözcükler: Türkçe ve İngilizce olmak üzere iki dilde yazılır ve yazının başlığını da içerir.

Öz 200 kelimeyi geçmemeli, çalışmanın ana noktaları olan amacını, hayvan ve örnek popülasyonunu, metodunu ve önemli sonuçlarını, çalışmadan elde edilen çıkarımı klinik olarak uygulanabilirliğini içermelidir. Yayını okumadan okuyucular için anlaşılır olmalıdır ve özet içinde kaynaklara atıf yapılmamalıdır. Türkçe ve İngilizce özetler ayrı sayfalarda yazılmalı ve özetlerin sonunda her iki dilden en az 3, en çok 5 anahtar sözcük yer almalıdır. Anahtar kelimeler Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH)'e uygun olmalıdır. Anahtar kelimeler için www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html adresine başvurulmalıdır.

Giriş bölümünde yazının dayandığı temel bilgilere ve gerekçelere kısaca değinildikten sonra, paragrafında amaç açık bir anlatımla yer alır. Gereç ve yöntem bölümü gerekirse araştırma/hasta/denek grubu, araçlar, uygulama ve istatistik değerlendirme gibi alt başlıklara göre düzenlenebilir. Bu bölüm çalışmaya katılmayan birisinin de rahatlıkla anlayabileceği açıklıkta yazılmalıdır. Bulgular bölümü çalışmanın sonuçlarını özetler ve temel bulgular gerekirse tablo ve şekillerle desteklenir. Tartışma bölümünde çalışmanın bulguları ilgili yurt içi ve yurt dışı çalışmaların sonuçları bağlamında tartışılır; genel bir gözden geçirmeyi değil, özgün bulguların tartışılmasını içerir. Yayın sisteme yüklenirken ana metin bölümü ana dosya olarak yüklenmelidir.

c) Teşekkür: Yazarlar çalışmalarında vermek istedikleri ek bilgiler ile katkı sağlayan destekçi kurumlara ve/veya şahıslara teşekkür yazılarını bu bölümde belirtebilirler.

d) Kaynaklar: Kaynaklar listesi alfabetik sıraya göre yazılmalıdır. Sadece yayınlanmış veya yayına kabul edilmiş kaynaklar yer almalıdır. Kabul edilmiş ancak henüz yayınlanmamış kaynaklar için "baskıda" ifadesi kullanılmalıdır. Yazarlar kaynaklar listesinde bulunan bütün kaynakların metin içinde kullanılmış olduğunu kontrol etmelidirler.

Yayındaki bütün kaynaklar kullanılmalıdır. Makale içinde referans kullanma şekline örnekler.

Metin içinde doğrudan atıf yapılırken yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir.

Örnekler: Bell (2005) tarafından; Nielsen ve Engberg (2006) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından
Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir.

Örnekler: ...bildirilmiştir (Bell, 2005); ...bildirilmiştir (Nielsen ve Engberg, 2006);bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007).

Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda kronolojik sıralama yapılmalıdır.

Örnekler:bildirilmiştir (Bell, 2005; Nielsen ve Engberg, 2006; Doyle ve ark., 2007).

Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir.

Örnek: (Bell, 2005a; Bell, 2005b; Bell, 2005c ...). Atıf yapılırken aşırı kaynak kullanımından kaçınılmalıdır.

Kaynaklar listesinin düzenlenmesi:

Mendeley programı kullanan yazarlar aşağıda linki verilen dergi format stilini kullanarak çalışmalarını düzenleyebilir:

<https://cs1.mendeley.com/styles/529990351/makusagbilensderg>

Kaynaklar listesinde yazar isimleri ve yayın yılı koyu harflerle yazılmalıdır. Kaynak listesi şu şekilde hazırlanmalıdır:

i) Kaynak makale ise

Yazarların soyadları ve adlarının ilk harfi yazılmalıdır. Devamında sırasıyla makalenin yayın yılı, makalenin adı,

yayınlandığı derginin açık adı, cilt, sayı ve sayfa numaraları belirtilmelidir.

Örnekler:

Cohen, N.D., Vontur, C.A., Rakestraw, P.C., 2000. Risk factors for enterolithiasis among horses in Texas. Journal of the American Veterinary Medical Association 216, 1787-1794.

Rajmohan, S., Dodd, C.E., Waites, W.M., 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. Journal of Applied Microbiology 93, 205-213.

Ono, K., Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. International Journal of Food Microbiology 47, 211-219.

Yayınlanmak üzere kabul edilen ve DOI numarası bulunan, ancak henüz basılmamış makaleler için; makale künyesinin sonunda DOI numarası belirtilmelidir.

McGregor, B.A., Butler, K.L., 2014. The value of visual fleece assessment in addition to objective measurements in identifying Angora goats of greater clean mohair production. Small Ruminant Research, in press (DOI: 10.1016/j.smallrumres.2014.04.001).

ii) Kaynak kitap ise

Yazarların (veya editörün) soyadları ve adlarının ilk harfi yazılmalıdır. Devamında sırasıyla kitabın yayın yılı, adı, yayınevi veya yayınlayan kuruluş ve yayınlandığı yer belirtilmelidir. Kaynak, kitaptan bir bölüm ise bölüm yazarlarının isminden sonra sırasıyla kitabın yayın yılı, bölümün adı, editörün soy ismi ve adının ilk harfi, bölümün alındığı kitabın adı, yayınevi veya kuruluş, yayınlandığı yer, bölümün sayfa numaraları yazılmalıdır.

Örnekler:

Combs, G.F., 1992. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Academic Press, San Diego.

Concannon, P.W., 1986. Physiology and Endocrinology of Canine Pregnancy. In: Marrow, D.A. (Ed.), Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 491-497.

Perkins, J.B., Pero, J., 2002. Vitamin biosynthesis. In: Sonenshein, A., Hoch, J., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells. ASM Press, Washington D.C., pp. 271-286.

Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P. (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.

iii) Kaynak bir tez ise

Tezi yazan kişinin soyadı ve adının ilk harfi koyu olarak yazılmalı, kabul edildiği yıl, tezin başlığı, tezin cinsi (yüksek lisans veya doktora), üniversitesi ve enstitüsü belirtilmelidir.

Örnek:

Bacinoğlu, S., 2002. Boğa spermasında farklı eritme süreleri ve eritme sonrasında oluşturulan soğuk şoklarının spermatolojik özelliklere etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

iv) Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise

Yazarların soyadları ve adının ilk harfi (Yazar adı yoksa web sitesinin veya kaynağın adı) yazılır. Daha sonra sırasıyla yılı, makalenin adı, varsa yayıncı, internet adresi ve erişim tarihi belirtilir.

Örnekler:

FDA, 2001. Effect of the use of antimicrobials in food-producing animals on pathogen load. Systematic review of the published literature. <http://www.fda.gov/cvm/antimicrobial/PathRpt.pdf> (Erişim 14.12.2001)

Cleveland, C.W., Peterson, D.S., Latimer, K.S., 2005. An Overview of Canine Babesiosis. Clinical Pathology. College of Veterinary Medicine, The University of Georgia: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Cleveland> (Erişim 17.12.2005).

Thierry, F., 2006. Contagious equine metritis: a review. Equine Reproductive Infections: <http://www.equinereproinfections.com> (Erişim 07.07.2006).

FSAI, 2008. Report of the Implementation Group on Folic Acid Food Fortification to the Department of Health and Children. Food Safety Authority of Ireland: <http://www.fsai.ie/assets/0/86/204/cc3c2261-7dc8-4225-bf79-9a47fbc2287b.pdf> (Erişim 20.06.2008)

v) Kaynak bilimsel toplantıda sunulmuş bir bildiri ise

Yazarların soyadı ve adının baş harfinden sonra sırasıyla toplantının yılı, bildirinin başlığı, toplantının adı, toplantı yeri, bildiri kitabındaki sayfa no yazılmalıdır.

Örnekler:

Cardinali, R., Rebollar, P.G., Mugnai, C., Dal Bosco, A., Cuadrado, M., Castellini, C., 2008. Pasture availability and genotype effects in rabbits: 2. development of gastro-intestinal tract and immune function of the vermiphorm appendix. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 1159-1164.

Mauget, R., Legendre, X., Comizzoli, P., 1998. Assisted reproductive technology in sika deer: a program to preserve endangered deer subspecies. In: Proc. 4th Int. Deer Biology Congress, Kaspovar, 185-186.

e) Tablolar: Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek (örneğin Tablo 1) atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir.

f) Şekil ve Resimler: Metinde kullanılan fotoğraflar, grafikler ve çizimler metin içinde şekil adı ile kullanılmalıdır. Şekiller kullanım sırasına göre numaralandırılmalı ve kısa başlıklarla ifade edilmeli, metin içinde

şekil numarası verilerek (örneğin Şekil 1) atıfta bulunulmalıdır. Şekil başlıkları şekillerin altında yer almalıdır. Şekillerde istenilen noktaya dikkat çekmek amacıyla; üzerlerine işaret konulmalı ve başlıklardan sonra yer alacak olan şekil altı notta kullanılan işaretler belirtilerek gerekli açıklamalar yapılmalıdır.

IV- Makale Süreci (Kör hakemlik)

Makale başvurusu yalnızca online olarak <http://dergipark.gov.tr/maeusabed> adresi üzerinden kabul edilmektedir. Sorumlu yazar, makale ile birlikte göndereceği tüm dosyaları yukarıdaki internet adresinde bulunan yeni makale gönder ikonunu tıklayarak sisteme ekleyebilir. Yazarlar dergiye gönderi yapmadan önce kayıt olmalıdır. Kaydı olduktan sonra, ana sayfadaki Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi ikonuna tıklayarak; yazım kurallarına göre düzenlenmiş bilimsel çalışmayı dergi panelindeki Makale Gönder kısmından 4 basamaklı (başlarken, yükleme, kaynaklar, önlendirme&gönder) gönderi işlemi yapabilir. Gönderilen makalede ön değerlendirme aşaması sırasında yazar künyeleri, çalışmanın yapıldığı kurum, etik kurul ya da özel izin adres bilgileri gibi tanıtıcı bilgiler içermemelidir. Ön değerlendirmeden (bilimsel nitelik, dil, yazım kuralları kontrolü, İntihal kontrolü iThenticate ve Turnitin programı.) geçen bilimsel çalışmaların hakem ataması yapılır. Sorumlu yazar makalenin hangi aşamada olduğunu sistem panelindeki Süreçteki Makaleler kısmından takip edebilir. Atanan hakemlere, kör hakemlik kuralları çerçevesinde çalışmanın tam metni, şekil, tablo, grafik ve resimleri sistem üzerinden yüklenerek e-posta aracılığıyla makale değerlendirme talebi gönderilir. Hakemler e-posta aracılığıyla gönderilen linke tıklayarak talebi kabul ya da reddederler. Kabul eden hakemler, kararlarını sistem üzerinden en fazla 1 ay içinde sebeplerle birlikte yüklemelidirler. Hakemin önerdiği düzeltme var ise tekrar yazara gönderilir. İstenilen düzeltmeler 1 ay içinde tamamlanıp gönderilmediği takdirde makale otomatik olarak iptal edilecektir. Editör, makalelerin yayın değerliliği ve hakemlerin görüşlerine dayanarak yayına kabul veya red kararını verir. İstenilen düzeltmeler yapıldıktan sonra makale yazar tarafından sisteme tekrar yüklenir. Derginin gizlilik bildiriminde belirtildiği gibi, yazarların kimlik bilgileri ve e-posta adresleri hiçbir şekilde başka amaçlar için kullanılmayacaktır.

Bu dergi; bilimsel araştırmaları halka ücretsiz sunmanın bilginin küresel paylaşımını artıracakı ilkesini benimseyerek, içeriğine anında açık erişim sağlamaktadır.

Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

I- Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute General Information

Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute (MAKU J. Health Sci. Inst.) is the publication of Mehmet Akif Ersoy University Health Sciences Institute. It is published two times annually. The journal is a peer-reviewed scientific journal in which basic and clinical scientific articles in the field of medical sciences (veterinary, medicine, dentistry, nursing and sports sciences) are published. The language of the journal is both Turkish and English. Papers submitted to the journal should not have been previously published, accepted for publication or be in the process of evaluation for publication in any other journal. This rule does not apply to articles presented as bulletins in scientific meetings and whose summaries are published. In such cases, however, the name, date and place of the meeting in which the paper was presented should be notified. The format of the article should be in accordance with the rules of "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/>)".

On receipt of the paper by the Editorial Board, the paper is evaluated for compliance with the format rules and the authors are informed about the result in four weeks. In the event that the paper is not found to comply with the general publication principles of the journal from the standpoint of either technical characteristics or general scope, the paper is rejected. Alternatively, the author(s) may be asked to re-submit the paper in accordance with the writing requirements. Papers resubmitted are passed through a similar technical examination and, if found to comply with the rules, are passed on for peer review. The paper is sent, without the title, to two reviewers selected by the board, who then assess the paper for scientific content and format compliance. When necessary the Editorial Advisory Board can send the paper to third reviewers. The selection of reviewers is ultimately at the discretion of the editor, associate Editors and/or the editorial board. The appropriate reviewers can be selected from journal's international database of reviewers listing or, if needed; independent reviewers can be determined from inland or abroad. Thereafter the Editorial Advisory Board carries out the final editing, taking the reports of the reviewers into consideration, and, when necessary, communicating with the author(s).

The Editor gives the final decision about the acceptance of the manuscript. The Editorial Board is authorized to publish the paper, return it for correction, or reject it. The assessment process involves research articles, case reports and original articles submitted to the journal. Other types of articles are evaluated directly by the Board. Papers submitted to the journal will not be returned whether they are published or not. The Editor and the Editorial Board have the right to reject, to require additional revision or to revise the format of manuscripts which do not follow the rules. The authors should inform the editorial board if they decide to withdraw the manuscript. The editor may consult editorial executive board about a manuscript if (s) he deems necessary. All the authors should submit a collectively signed statement that there is no conflict of interest regarding scientific contribution or responsibility. The association, establishment, and medication-material supply firms which have given financial, even partial, or material support to the research should be mentioned in a footnote. No fee or compensation will be paid for articles published in the journal.

The Editorial Board assumes that the author(s) are obliged not to submit the paper to another journal before completion of the assessment process. In the "method" section of articles concerned with experimental research on humans or animals, a sentence showing that the informed consent of patients and volunteers has been obtained following a detailed explanation of the interventions carried out on them. In such studies, authors should clearly state the compliance with internationally accepted guidelines (1975 Helsinki declaration revised in 2002 <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>, Guide for the care and use of laboratory animals-www.nap.edu/catalog/5140.html) issued by the Republic of Turkey Ministry of Health and published in the Official Journal dated 29 January 1993 number 21480 "Regulations Concerning Drug Research", and other more recently published rules laid out in governing statutes. They should forward a copy of the Ethic Committee Approval received from the relevant institution. Standard abbreviations used in the text are written in full when first mentioned. In the use of drugs, the generic names should be written in their Turkish pronunciation spelling form. Measurement units are given according to the metric system; e.g. written as "mg", no punctuation is used, in the case of extensions (,) is used as a separator. Laboratory measurements are reported in International System Units (US; Systeme Internationale; SI).

Scientific responsibility

All scientific responsibility of the articles belongs to the authors. The authors of the submitted article must have a specific contribution to the work. Authors' name ordering should be a joint decision. Corresponding author is considered to accept the author sorting by filling in "Author Responsibility and Publication Transfer

Form" on behalf of all authors. All of the authors should be listed under the title of article.

Publication Fees

Publication in this journal is totally FREE. There are no publication charges, no submission charges, no article processing charges and no surcharges based on the length of an article, figures or supplementary data. Editorial items (Editorials, Corrections, Additions, Retractions, Letters, Comments, etc.) are published free of charge.

Ethical responsibility

The authors are responsible for their compliance with the ethical rules. In experimental studies on animals, it should be noted that the study protocol has been approved by the animal experiment ethics committee at the institution where the study was conducted. Authors should submit the ethics committee's approval with the article. If there are previously published text, tables, pictures, etc. in the article, the authors have to get written permission from the copyright holder and the authors should specify and indicate the used material in the manuscript. In the course of the manuscript evaluation, the authors may be requested to submit the research data and / or the ethics committee approval document if deemed necessary.

Plagiarism policy

Manuscripts submitted to Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute is evaluated in terms of plagiarism. Every submitted article is checked for plagiarism through iThenticate and Turnitin software. When Similarity Index of the article is above %20, it is sent back to the corresponding author to revise it. If plagiarism is proved after publication of the article, that article will be immediately removed from the website and the concerned authors will be considered ineligible for publication of their articles in Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute.

II- Types and Characteristics of Papers to be Submitted to the Journal

a) Research Articles: These articles are prepared in full accordance with the writing style definitions given below, in which previously unpublished original research data are evaluated. The main text section of the research articles should include (Title, Introduction Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion) sections and (excluding title page, bibliography, tables/figures/pictures) should not exceed 20 pages. If some parts of the research data given in these articles have previously been discussed in another paper, this must be notified without fail when sending the paper and, in addition, reference should be made to the relevant paper within the bibliography.

b) Review Articles: Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to editor.

c) Case Reports: These are articles which present and discuss the characteristics of one or more cases which have special features and scientific importance from the clinical evaluation, observation or other standpoint. Case presentations include the title page, summary, main text (includes introduction, case and discussion), bibliography, table/figure/picture sections; subtitles in the main text are organised according to the text content. Abstracts of the case presentations should have 150 words. The main text (excluding title page, bibliography, table/figure/picture) should not exceed 10 pages.

d) Brief Reports: These are articles in which original ideas dealing with important theoretical or practical problems related to a specific subject are presented and discussed. Original articles include a title page, summary, main text, bibliography, table/figure/picture sections; subtitles in the main text are organised according to the text content. The main text of original articles (excluding title page, bibliography, table/figure/picture) should not exceed 10 pages.

e) Special Sections:

1. Letters to the Editor: These articles include evaluation and criticisms of articles published in the journal. These are published together with the responses of the author(s) of the paper concerned where possible. Letters to the Editor may not exceed 5 pages.

2. Meeting news/notes: These articles introduce scientific meetings held or to be held on subjects within the scope of the journal. The paper may not exceed 1 page.

3. Journal news: These articles introduce scientific journals being published within the scope of the journal. The paper may not exceed 1 page.

4. Introduction of websites: These articles introduce websites relevant to the scope of the journal. These articles may not exceed 1 page.

5. Book/Thesis Section: These articles introduce books/theses published on subjects related to the scope of the journal and may not exceed 3 pages.

III- Preparation of Manuscripts

Papers to be submitted to the journal include the sections of title page, abstract, main text, references and tables/figures/pictures. Articles submitted for publication in the journal should follow the following formal principles: The text should be prepared in Microsoft Word program in Times New Roman font style with a font size of 12 font, black and 1.5 line. All side of the paper, page margins should be as 2.5 cm. Line numbers should be added to the beginning of the page.

Anatomical terms should be used as written in Latin. Running title (not exceed 40 characters) of the manuscript should add to title page. The name of the clinic, department / science, institute and institution should be stated.

a) Title Page: should contain the category, the title (only first letter capital), the names of the authors (only the first letters capital), the institution (s) where they work (indicated with numbered footnotes), corresponding author (address, phone, fax numbers and e-mail address). Corresponding author is indicated by an asterisk (*). If the article was previously presented at a scientific meeting, the name, date and place of the meeting must be stated.

b) Main Text: The main text of the paper is organised under the subtitles of Abstract and Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

Abstract and Keywords: This is written in two languages, Turkish and English, and also includes the title of the paper. The abstract is consists of 200 words. The abstract should bring out the main points of the manuscript and should include the following information: objective, the animals or sample population involved, design, the materials and methods used, the main results, a brief conclusion and clinical relevance, where applicable. They should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided. At the end of the abstract, at least 3, at most 5 keywords in both languages are included.

In the introduction, following a brief statement of basic information and justifications which constitute the basis of the paper, the objective is clearly given in the last paragraph. If necessary, the “method” section may be organised according to sub-titles such as research/patient/ test group, instruments, application and statistical analysis. This section should be written with clarity so that a person not involved in the study may easily understand. Results summarize the findings of the study and, when necessary, basic findings are supported with tables and figures. In the discussion section, the findings of the study are discussed in the light of relevant national and international studies; this section includes discussion of original findings, not a general review.

c) Acknowledgements: When considered necessary, author(s) may add brief acknowledgements in a few sentences to those whose contributions to the paper are not at author level but deserve to be mentioned. Here, the contributions of those acknowledged (e.g. financial or equipment aid, technical support etc) are clearly stated (e.g. “scientific counseling”, “editing of the draft”, “data collection”, “participation in clinical research” etc).

d) Bibliographic References:

All citations in the text should refer to: the year of publication of the reference should be indicated in parentheses after the surname of the author or authors.

Examples: Bell (2005), Nielsen and Engberg (2006), Doyle et al. (2007) were indicated that.....

The name of the author and the year of publication should be stated in parentheses at the end of the sentence.

Examples: ...were detected as 23% of the samples (Bell, 2005); ...were detected as 23% of the samples (Nielsen and Engberg, 2006); ...were detected as 23% of the samples (Doyle et al., 2007).

In case of more than one reference, references should be arranged chronologically.

Examples: ...were reported that... (Bell, 2005; Nielsen and Engberg, 2006; Doyle et al., 2007).

More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples: (Bell, 2005a; Bell, 2005b; Bell, 2005c ...)

The authors can use below formatted style link in mendeley:

<http://csl.mendeley.com/styles/529990351/sagbilensderg>

References should be written in alphabetical order. Reference style, the authors' names and year of publication should be written in bold. Source list should be prepared as follows:

i) Examples of journal articles:

Cohen, N.D., Vontur, C.A., Rakestraw, P.C., 2000. Risk factors for enterolithiasis among horses in Texas. Journal of the American Veterinary Medical Association 216, 1787-1794.

Rajmohan, S., Dodd, C.E., Waites, W.M., 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology* 93, 205-213.

Ono, K., Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology* 47, 211-219.

For articles that are accepted for publication and have a DOI number but not yet published; DOI number must be specified at the end of the article.

McGregor, B.A., Butler, K.L., 2014. The value of visual fleece assessment in addition to objective measurements in identifying Angora goats of greater clean mohair production. *Small Ruminant Research*, in press (DOI: 10.1016/j.smallrumres.2014.04.001).

ii) Books:

Combs, G.F., 1992. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health.* Academic Press, San Diego.

Concannon, P.W., 1986. *Physiology and Endocrinology of Canine Pregnancy.* In: Marrow, D.A. (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology.* Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 491-497.

Perkins J.B., Pero, J., 2002. Vitamin biosynthesis. In: Sonenshein, A., Hoch, J., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells.* ASM Press, Washington D.C., pp. 271-286.

Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus.* In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens.* Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.

iii) Thesis:

Bacinoğlu, S., 2002. Boğa spermasında farklı eritme süreleri ve eritme sonrasında oluşturulan soğuk şoklarının spermatolojik özelliklere etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

iv) Web site or author is an institution:

FDA, 2001. Effect of the use of antimicrobials in food-producing animals on pathogen load. Systematic review of the published literature. <http://www.fda.gov/cvm/antimicrobial/PathRpt.pdf> (Accessed: 14.12.2001)

Cleveland, C.W., Peterson, D.S., Latimer, K.S., 2005. An Overview of Canine Babesiosis. *Clinical Pathology.* College of Veterinary Medicine, The University of Georgia: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Cleveland> (Accessed: 17.12.2005).

Thierry, F., 2006. Contagious equine metritis: a review. *Equine Reproductive Infections:* <http://www.equinereproinfections.com> (Accessed: 07.07.2006).

FSAI, 2008. Report of the Implementation Group on Folic Acid Food Fortification to the Department of Health and Children. Food Safety Authority of Ireland: <http://www.fsai.ie/assets/0/86/204/cc3c2261-7dc8-4225-bf79-9a47fbc2287b.pdf> (Accessed: 20.06.2008).

v) Paper presented at a scientific meeting

Cardinali, R., Rebollar, P.G., Mugnai, C., Dal Bosco, A., Cuadrado, M., Castellini, C., 2008. Pasture availability and genotype effects in rabbits: 2. development of gastro-intestinal tract and immune function of the vermiform appendix. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 1159-1164.

Mauget, R., Legendre, X., Comizzoli, P., 1998. Assisted reproductive technology in sika deer: a program to preserve endangered deer subspecies. In: Proc. 4th Int. Deer Biology Congress, Kaspovar, 185-186.

e) Tables: Each table is printed on a separate page and numbered according to the sequence of referral within the text (Table 1). Each table has a title and, when necessary, explanations are given under the table (e.g. abbreviations given in the table). Each table should be understandable without need for referral to the text. Each table should be referred to in the text..

f) Figures and Pictures: Figures should be numbered according to the order of use and should be expressed with short titles. Figures should be numbered in the text (Figure 1). Letters, numbers and symbols within the figure should be clear and readable when downsized for printing. Each figure should be referred to in the text..

IV- Submission of Articles (Blind Peer-Review)

The article submission is only accepted online via '<http://dergipark.gov.tr/maeusabed>' The Corresponding authors, all the files can be added to the system by clicking the submit new article icon at the above address. Authors must register on Dergipark system before submitting a manuscript. After signing up, clicking Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences icons on the main page, the manuscript written according to the guide for authors is submitted in 4 steps (start, submission, reference, preview & submit). The submitted manuscript must not contain any identifying information, such as author information, institution, ethics committee or special permit address, during the preliminary evaluation phase. The manuscript that pass the preliminary evaluation (paper scientific qualification, language, conformity to Guide for author and checking plagiarism via iThenticate and Turnitin program,) are assigned to the Reviewers. The corresponding author can follow the article evaluation process from the section on the Articles in the Process. According to the blind peer-review rules, the main text, tables, graphics and pictures of the manuscript are uploaded via the system and sent to the appointed reviewers for an article evaluation request via e-mail. The reviewers accept or reject the request by clicking on the link sent via e-mail. The reviewers who accept it have to upload their decisions together with the reasons within a maximum of 1 month via the system. If the correction requested by the Reviewer is sent back to the author. If the requested corrections are not completed within 1 month, the article will be automatically canceled. After the

desired corrections are made, the article is uploaded back to the system by the author. The editor makes decisions to accept or reject papers based on their opinion of the papers' publication worthiness and reviewers' comments. As stated in the privacy statement, authors' identity information and e-mail addresses will not be used for any other purpose.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ

(*Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute*)

MÜRACAAT VE YAYIN HAKLARI DEVİR FORMU

(*Application and Copyright Transfer Statement*)

Derginin kısaltılmış adı: "MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg." dir.

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisinde yayınlanmak üzere göndermiş olduğumuz "....." adlı

Orijinal Araştırma / Research Articles (),

Derleme / Review Articles (),

Gözlem / Case Reports (),

Editöre Mektup / Editorial Letter (),

Diğer / Other (), (.....) ile ilgili olarak;

The authors confirm the following statements:

1-that there has been no duplicate publication or submission elsewhere of this work

2-that all authors have read and approved the manuscript, are aware of the submission for publication and agree to be listed as co-authors.

1-Bu makalenin/derlemenin bir kısmı ya da tamamı başka bir dergide yayınlanmamıştır.

2-Bu makale/derleme yayınlanmak üzere başka bir dergiye gönderilmemiştir.

3-Makale/derleme yayınlandıktan sonra tüm hakları Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisine devredilmiştir.

4-Tüm yazarlar makaleyi okumuş ve onaylamıştır. Yayınlanmak üzere dergiye gönderildiğinden haberdardır.

5-Tümü veya bir bölümü yayınlandı ise derginizde yayınlanabilmesi için gerekli iznin alındığını garanti ederiz.

Aşağıdaki maddelerde belirtilen haklarımız saklı kalmak kaydı ile makalenin telif hakkını Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ve imza ederiz.

a- Telif hakkı dışında kalan patent vb. bütün haklar,

b- Yazarların ders, kitap gibi çalışmalarında makaleyi ücret ödemeksizin kullanabilme hakkı,

c- Satmamak üzere kendi amaçları için makaleyi çoğaltma.

Yazarlar / Author Name (tüm yazarlar tarafından imzalanacaktır)	İmza / Signature	Tarih / Date

Yazışma adresi / Corresponding author address:		
Telefon:	Fax:	E-mail:@.....

(Form doldurulup imzalandıktan sonra; "Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi Editörlüğü, 15030-BURDUR" adresine yollayınız).

This Form should be signed by all authors OR by the corresponding (or senior) author who can vouch for all co-authors. A scanned copy of the completed Form may be submitted online. Alternatively, the completed Form may be faxed to the relevant Editor:



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Araştırma Makaleleri / Research Articles	Sayfa/Page
Effect of Water-Cooled Loop Monopole Antenna on Microwave Ablation Efficiency Olumuyiwa ADEWUMI, Okechukwu AGBASI, Oluwanifesii FATILE	41-54
Sepsisli Neonatal Buzağılarda Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması <i>Investigation of Some Hematologic and Biochemical Parameters in Neonatal Calves with Sepsis</i>	
Yasemin BEYDİLLİ, Halil İbrahim GÖKÇE	55-67
Lysimachia Savraniî'nin Hücre Kültürü Ortamında Normal Hücrelere Göre Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi <i>The Effect of Lysimachia savranii on the Breast Cancer Cells in Cell Culture Conditions Compared to Normal Cells</i>	
Işıl AYDEMİR, Caner ÖZBEY, Gonca DÖNMEZ ARAT, Oktay ÖZKAN, Ahmet SAVRAN, Sevinç İNAN, Mehmet İbrahim TUĞLU	68-75
Yaşlı Evde Bakım Hastaları Risk Değerlendirme Ölçeği Geliştirme Çalışması <i>The Development of a Risk Evaluation Scale for Elderly Patients with Home Healthcare</i>	
Deniz Say SAHİN, Melek ZUBAROĞLU YANARDAG, Umut YANARDAG	76-88
Erkek Kızıl Tilki Genital Organları (Vulpes vulpes); Makroanatomik ve Üç Boyutlu Rekonstrüksiyon Görünüşü <i>Male Genital Organs in the Red Fox (Vulpes vulpes); Macroanatomic and Three-dimensional Reconstruction Aspect</i>	
Ayşe HALIGÜR, Sema ÖZKADİF	89-98
Saanen Olaklarında Şiddetli Strüvit Ürolitiazisi <i>Severe Struvite Urolithiasis in Saanen Kids</i>	
Mehmet Çağrı KARAKURUM, Şima ŞAHİNDURAN, Metin Koray ALBAY	99-104
Isparta İli ve Çevresinde Sığırcılık İşletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması <i>Serological Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Isparta Province</i>	
İlker BİLGİLİ, Nuri MAMAK	105-113
Denizli ve Burdur Yöresindeki Sığırlarda Bovine Respiratory Syncytial Virus Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması <i>Serological Investigation of Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection in Cattle in the Denizli and Burdur Districh</i>	
Arif KARAOTÇU, Yakup YILDIRIM	114-123
Rosa canina Özütü Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi ve İnsan Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı HT29 Üzerindeki Anti-kanser ve Anti-metastatik Aktivitesi <i>Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Rosa canina Extract and Its Anti-cancer and Anti-metastatic Activity on Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT29</i>	
Çiğdem AYDIN ACAR, Suray PEHLİVANOĞLU	124-131

Saha Şartlarında Sınırlı Sığır Popülasyonunda Dermatofitozis Hastalık Aktivitesi ile Serum 25 (OH) D3 Vitamin Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi,
Determination of the Relationship Between Dermatophytosis Disease Activity and Serum 25 (OH) D3 Vitamin Levels in Limited Cattle Population Under Field Conditions

Deniz ALIÇ URAL, Songül ERDOĞAN

132-138

Mercanköşk (Origanum Onites L.) Bitkisinin Bazı Gıda Patojenleri Üzerine Antibakteriyel Etkinliğinin Saptanması

Detection of Antibacterial Effect of Oregano Plant (Origanum Onites L.) on Some Food Pathogens

Ahmet Hulusi DİNÇOĞLU

139-146

Olgu Raporu / Case Report

Hipotiroidizme karşı hipertiroidizm: İki kedide büyüme geriliğine karşı miliyer dermatitis/hipersensitivite

Hypo-versus Hyper-thyroidism in 2 Cats: The Culprit for Miliary Dermatitis/Hypersensitivity Versus Growth Retardation

Songül ERDOĞAN, Kerem URAL, Hasan ERDOĞAN

147-152

Effects of Water-Cooled Loop Monopole Antenna on Microwave Ablation Efficiency

Adewumi Olumuyiwa FEMI¹ , Okechukwu Ebuka AGBASI^{2*} , Fatile Oluwanifesii
EMMANUEL³  Sunday Edet ETUK⁴ 

¹Department of Radiology, Federal Medical Center, Owo, Nigeria.

^{2*}Department of Physics, Michael Okpara University of Agriculture, Umudike Nigeria.

³Olusegun Obasanjo Presidential Library, Oke-Mosan, Abeokuta, Nigeria.

⁴Departement of Physics, University of Uyo, Uyo, Nigeria.

Abstract: This work compares the effect of a monopole antenna without cooling unit on a biological tissue and a monopole antenna with cooling unit. Computer simulation was done using a computer software named COMSOL Multiphysics™, input power was varied from 10W to 120W, with an interval of 10W, at different times, from 60s to 120s at an interval of 60s. It was observed that the diameter of the lowest power (20W) decreased by -17.2% at 5mins, the length decreased by -32.9% and aspect ratio for the two antennas increased by 23.40%. For medium power (60W), at 5mins, the diameter decreased by -9.89%, length decreased by -37.9%, and aspect ratio decreased by 45.24%. The p-value obtained from diameter for low power showed no significant difference for ablation without water cool ($p > 0.005$), but showed significant difference with water cool ($p < 0.005$), diameter for medium power showed no significant difference, $p > 0.005$ in both simulations, there was no statistically significant difference in the diameter for high power (110W and 120W) for both simulations, p -value > 0.005 . The result showed that inclusion of cooling unit reduced backward heating of microwave antenna, ablation length, and ablation diameter of simulated tissue.

Keywords: Aspect ratio, Closed loop, Microwave ablation, Significant difference.

*Corresponding author : Okechukwu Ebuka AGBASI e-mail : agbasi.okechukwu@gmail.com
Geliş tarihi / Received : 10.07.2019 Kabul tarihi / Accepted: 09.09.2019

Introduction

There is a wide spread of cancers today, hence, various treatment modalities such as the use of radiations (like x-ray, gamma ray), ablation, ultrasound and others have been developed to approach different form of cancer cases. However, minimally invasive tissue ablation has become of central importance in the modern surgery armamentarium, because it does not involve the use of ionizing radiation which can be damaging to healthy tissues if not properly managed, it is also less invasive. In the treatment of benign or malignant tumors, it is important to achieve ablation of the undesirable tissue in a well-controlled and precise way without affecting the surrounding healthy tissue. As an alternative to surgical resection, numerous thermal and non-

thermal ablation modalities are available, including: radiofrequency (RF) ablation, microwave ablation, cryoablation, high-intensity focused ultrasonography (US), laser ablation, irreversible electroporation, chemical ablation (with ethanol and acetic acid), and brachytherapy (Hinshaw et al., 2014; Simon, et al., 2005; Açıkgöz and Türer, 2014; Shock et al., 2004). These ablation therapies make use of different antennas: slot, dipole, cap-choke, sleeve and monopole (Kaur and Maini, 2007; Lin and Wang, 1996). However, monopole antennas are frequently use in tumor ablation (Bertram et al., 2006), this article focuses on effect of a closed loop monopole water cool antenna on microwave ablation efficiency.

Material and Methods

Material

A computer software (COMSOL Multiphysics™) was used for computer simulation. A 2.45GHz solid-state MW generator (SAIREM SAS 200W, NeyronCedex France), with a variable output power from 20 to 120W in step of 10W was used to generate power for different time durations. Monopole antenna was designed from a 50 Ω UT-0.085' semi rigid coaxial cable (RG405 Coax, Pasternack Enterprises Inc, Los Angeles, CA), the inner conductor was made from silver-plated copper clad steel, while the outer conductor was made of copper, and the coaxial dielectric used was a low-loss solid polytetrafluoroethylene (PTFE). The Polytetrafluoroethylene (PTFE) thread seal tape was used to enclose antennas to prevent adhesion of the probe to desiccated ablated tissue and to ensure easy removal of the antenna. A water-cooled syringe pump was used to pump cool water to the antenna, to cool the system and prevent backward heating. Channel Data logging Thermometer (SPER Scientific Ltd) was as well used to measure the temperature of the system. Micrometer screw gauge and ruler were used to measure the diameter of the antennas.

Methods

Computer simulation was done using a computer software named COMSOL Multiphysics™, input power was varied from 10W to 120W, with an interval of 10W, at different times, from 60s to 120s at an interval of 60s.

Antenna Fabrication

Monopole antenna were designed from 50 Ω UT-0.085' semi rigid coaxial cable (RG405 Coax, Pasternack Enterprises Inc, Los Angeles, CA). The antennas consist of thin coaxial cables with internal and external conductor made of copper, and their tip soldered. The water-cooled antenna was enclosed in a sleeve (catheter) made of PTFE (polytetrafluoroethylene a biocompatible dielectric

material) through which a cooling water could flow through. The antenna was operated at 2.45 GHz, a frequency widely used in microwave coagulation therapy.

Experimental Validation

Experiments were performed with a custom-designed microwave applicator on ex-vivo bovine liver (cattle liver) obtained from a local abattoir. The applicator used for all experimentation was a 2.45 GHz, 200-Wmicrowave device with an active 5.7-mm-diameter radiator, powered by a magnetron generator. The antenna was connected to the microwave generator (SAIREM SAS 200W, NeyronCedex France), and the generator output was set properly to ensure appropriate power delivery and to compensate for cable losses. ASP-1800 syringe pump was used to pump water through the water-cooled antenna.

Tissue Coagulation Process

Input power and the slot size were set, other quantities such as reflection coefficient, total power dissipation, ablation diameter, ablation length and were determined. The parameters from the computer simulation were measured and recorded and the power generated by the simulation with the aid of a divider and a ruler. The ablated tissues were sliced along the antenna axis to determine the diameters and lengths of ablated zone. Each ablated zone was photographed for further analysis with ImageJ software. The aspect ratio was determined by dividing the measured tissue diameters by the tissue lengths.

Statistical Analysis

SPSS was used to analyze the data's, and paired t test was used to obtain the p-values, standard deviation was used to show the variation and relation relationship between the obtained values. Also, the percentage differences in the ablation coagulation diameters, lengths and aspect ratios of the data were compared.

Results

In the study, a total of 36 computer simulations were carried out and experimental validation was also done with bovine liver. Comparison the results of ablation with close looped monopole water cooled microwave antenna and result with monopole antenna that has no water cool system

was made. The powers were 20, 30, 50, 60 and 110, 120 representing low, medium and high power respectively. The initial and final temperatures for every simulation was recorded. Thereafter, the diameter and length were measured to calculate the aspect ratio.

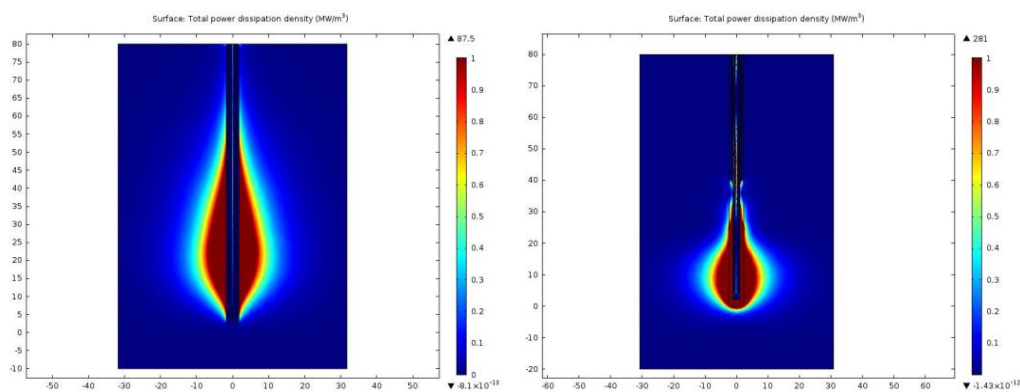


Figure 1a i and ii Result of 20W for 3min without water cool and with water cool respectively.

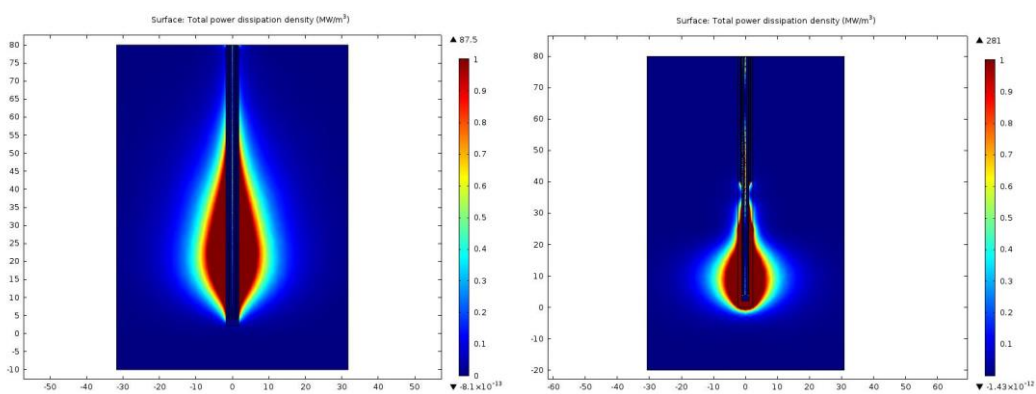


Figure 1b i and bii 20W for 5mins without water cool and with water cool respectively.

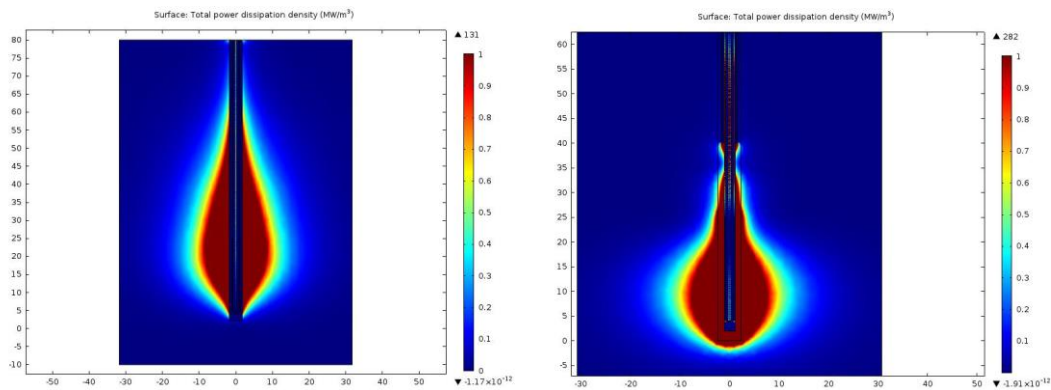


Figure 1c i and ii for 10min without water cool and with water cool respectively.

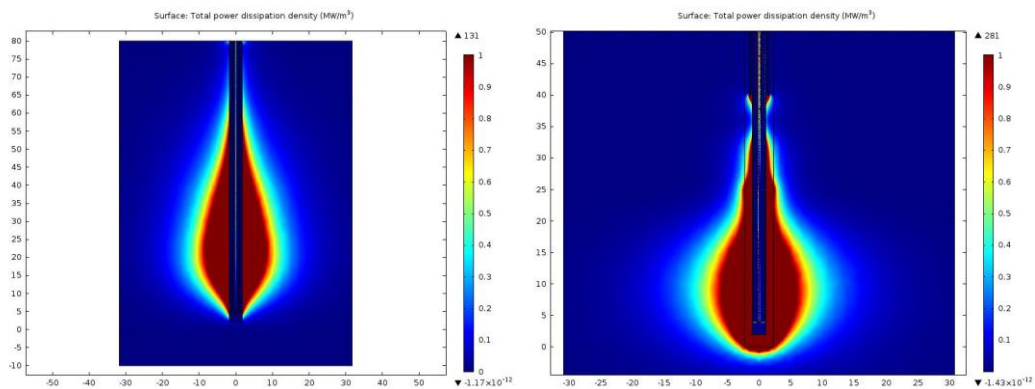


Figure 1d i and ii 30w for 3mins without water cool and with water cool respectively.

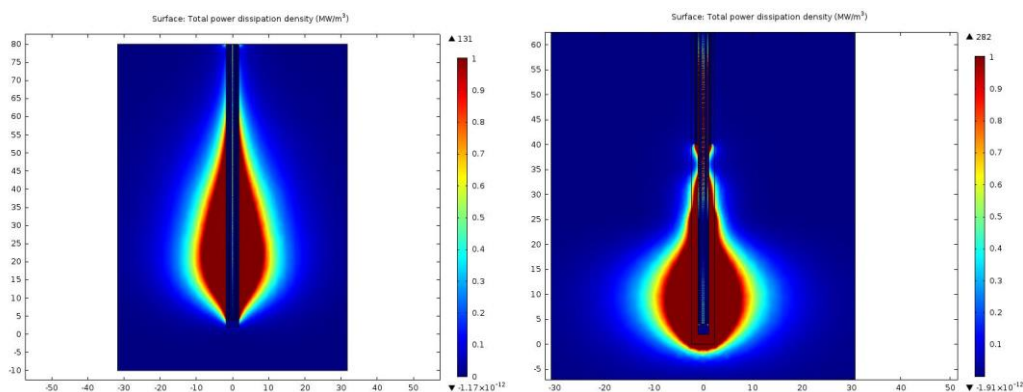


Figure 1 e i and ii 30w for 5mins without water cool and with water cool respectively.

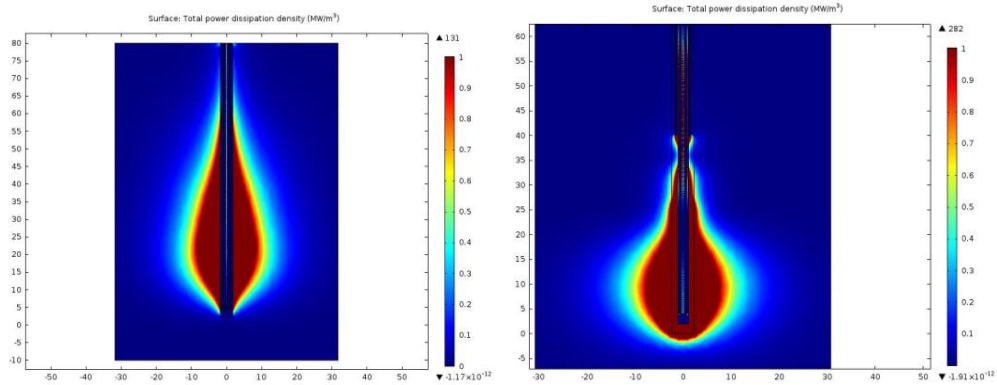


Figure 1 f i and ii 30watts 10mins without water cool and with water cool respectively.

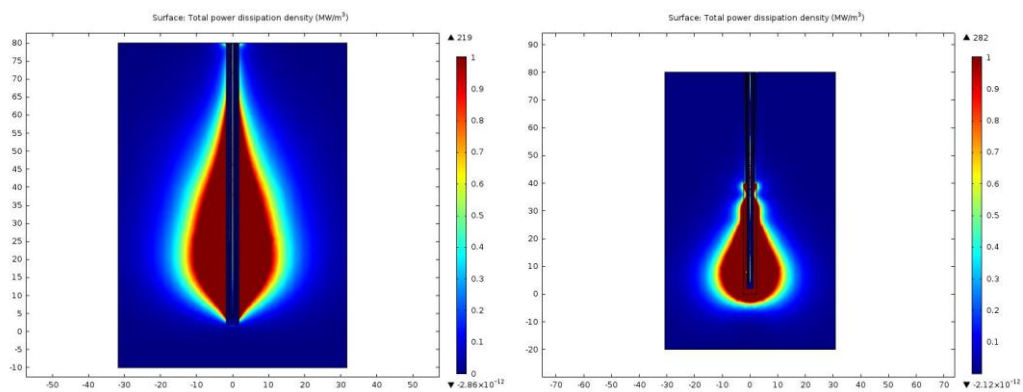


Figure 1 g i and ii 50w for 3mins, without water cool and with water cool respectively.

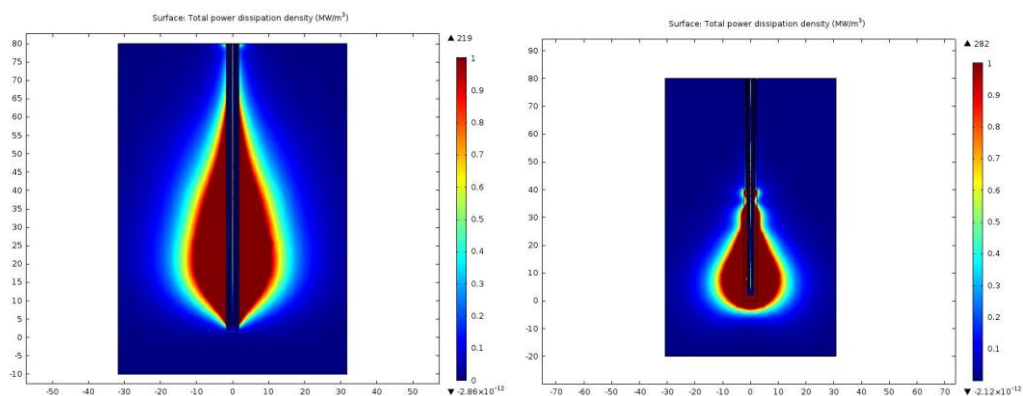


Figure 1 h i and ii 50w for 5mins, without water cool and with water cool respectively.

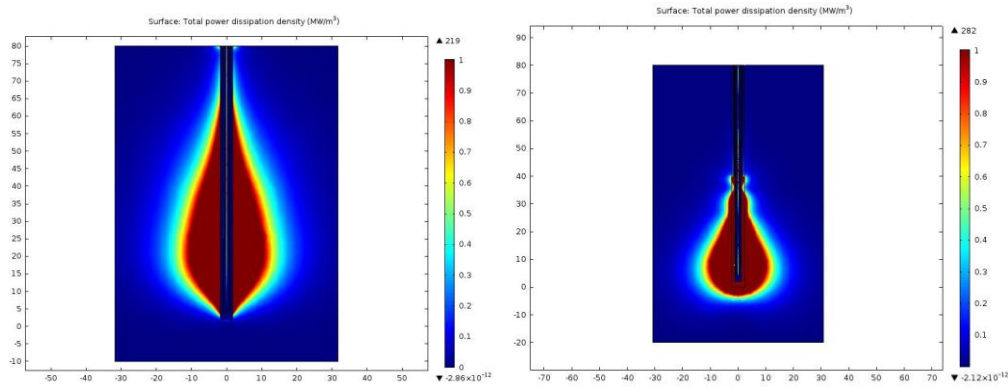


Figure 1 I i and ii 50w for 10mins without water cool and with water cool respectively.

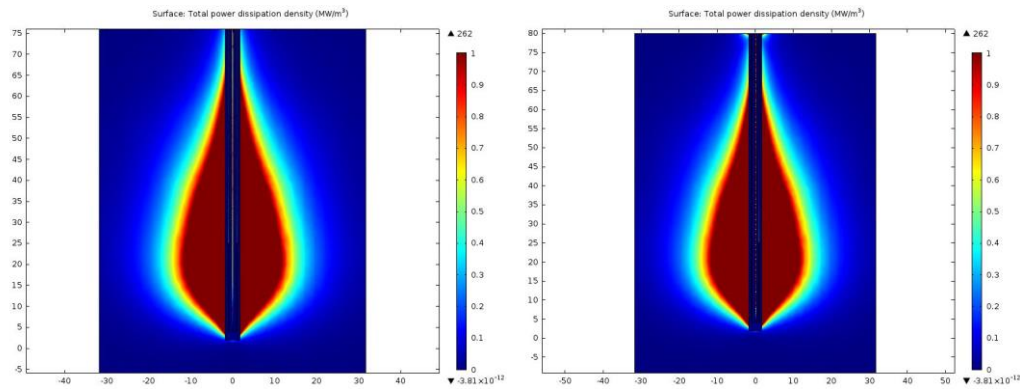


Figure 1j ii and ii . 60w for 3mins without water cool and with water cool respectively.

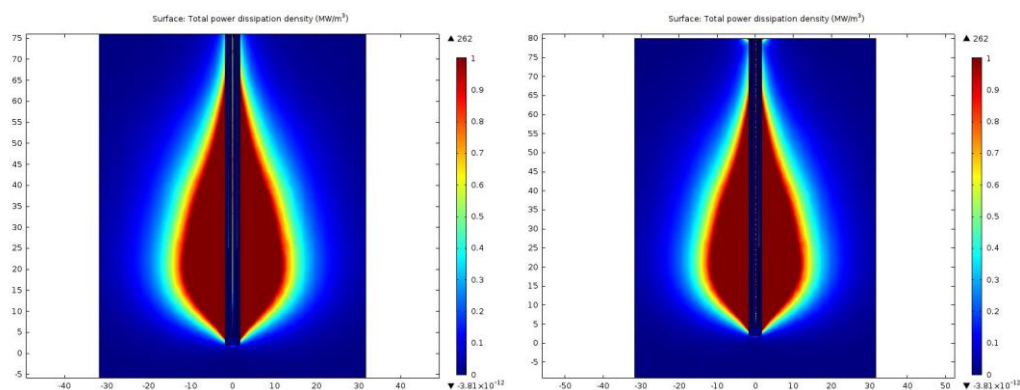


Figure 1k i and ii 60w for 5mins, without water cool and with water cool respectively.

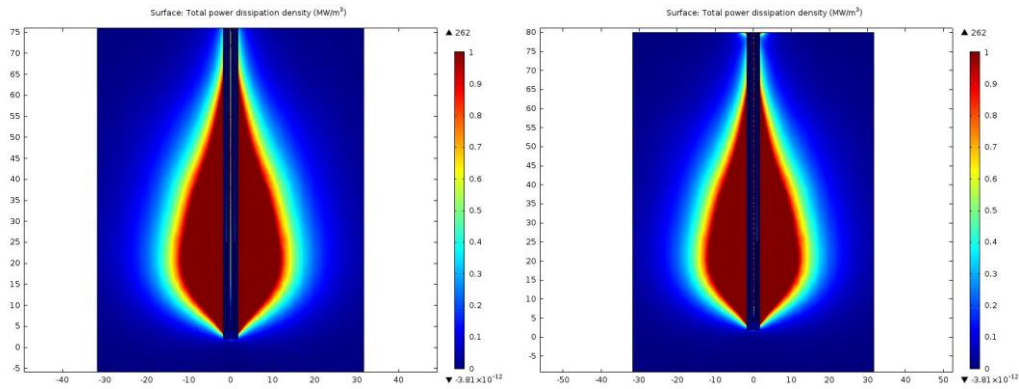


Figure 1L i and ii 60w for 10mins without water cool and with water cool respectively.

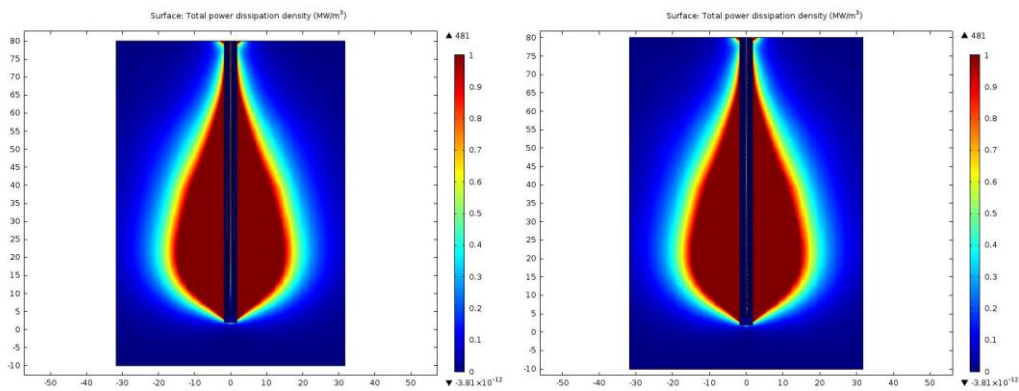


Figure 1 m i and ii 110w for 3mins without water cool and with water cool respectively.

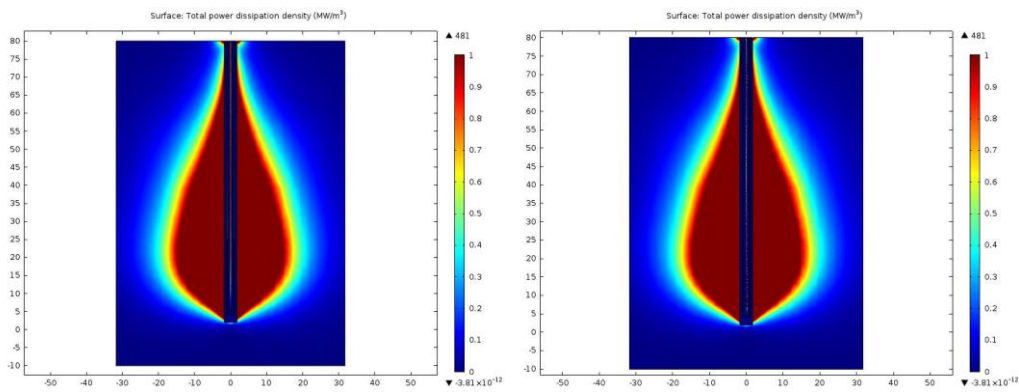


Figure 1 n i and ii 110w for 5mins without water cool and with water cool respectively.

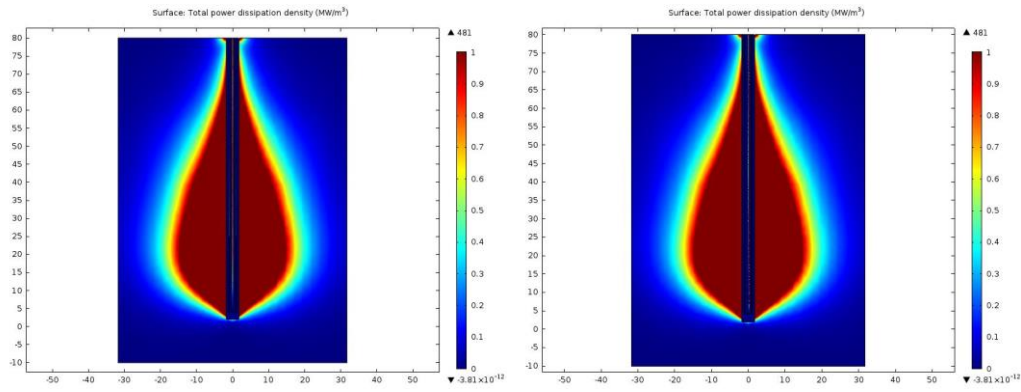


Figure 1 O i and ii 110w for 10mins without water cool and with water cool respectively.

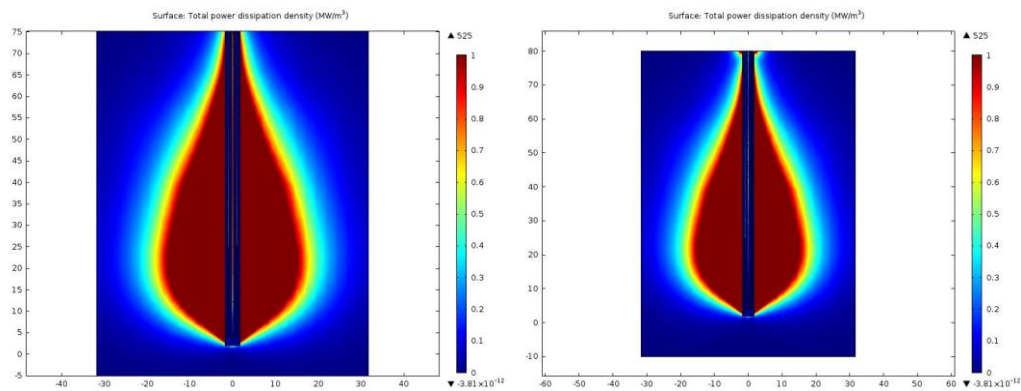


Figure 1 P i and ii 120w for 3mins without water cool and with water cool respectively.

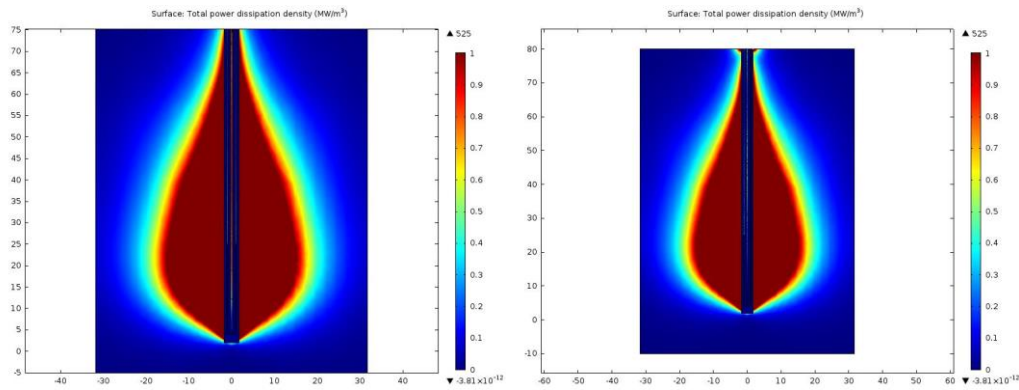


Figure 1Q i and ii 120w for 5mins without water cool and with water cool respectively.

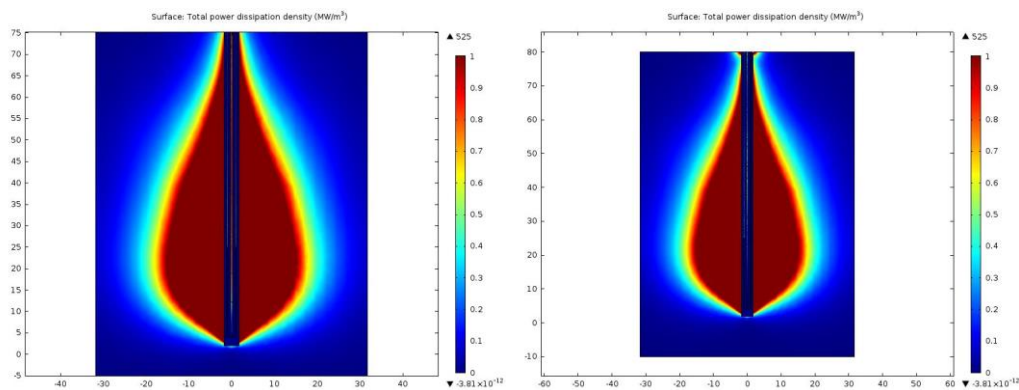


Figure 1 R i and ii 120w for 10mins without water cool and with water cool respectively.

Table 1. Simulation reading of time and diameter of antenna without cooling unit

Time	D ₀ 20W (mm)	D ₀ 30W (mm)	D ₀ 50W (mm)	D ₀ 60W (mm)	D ₀ 110W (mm)	D ₀ 120W (mm)
60	8.45	12.1	13.3	18.8	20.78	20.75
120	14.27	18.35	20.5	27.52	28.1	28.98
180	17.95	22.38	23.5	29.88	32.68	33.58
240	20.65	25.14	27.2	33.58	36	37.42
300	23.05	28.04	28.7	36.38	36.68	41.78
360	24.9	29.71	31.2	38.54	40.18	42.78
420	26.27	31.58	31.8	40.48	42.18	43.48
480	27.44	32.94	33.15	42.08	42.82	44.9
540	28.48	33.94	34.4	43.36	44.92	46.34
600	29.28	34.6	34.7	44.38	46.02	46.98

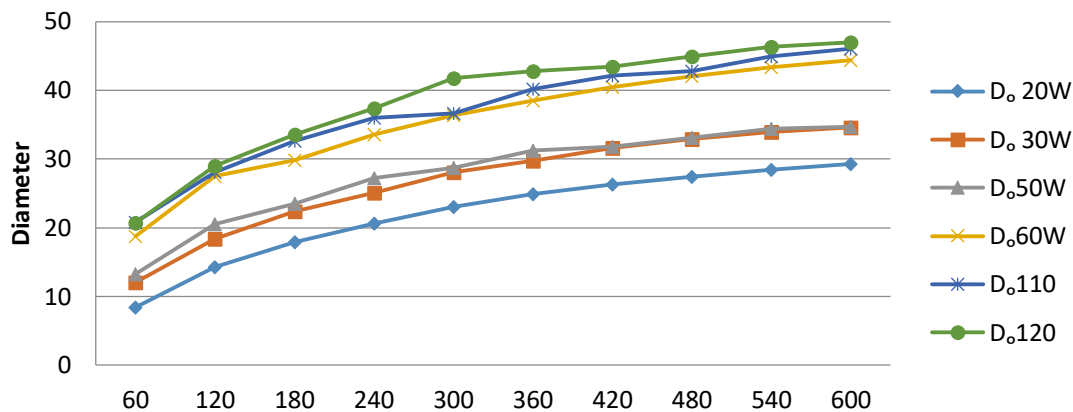


Figure 2. The diameter (mm) against time(s), for simulation without water cooled unit

- The graph shows that ablation diameter increases with time from 60s to 600s, with 600s having the highest diameter.
- It also shows that ablation diameter increases with respect to power from 20w to 120w, with 120w having the highest diameter.

All the mean diameters of simulation with water cool antenna were also tabularized, for ablation of 20W, 30W, 50W, 60W, 110W and 120W at time 60(s) - 600(s) as shown below.

Table 2. Simulation reading of time and diameter of antenna with water cooled unit

Time	D _{0.20W} (mm)	D _{0.30W} (mm)	D _{0.50W} (mm)	D _{0.60W} (mm)	D _{0.110W} (mm)	D _{0.120W} (mm)
60	6.82	10.48	14.78	16.4	19.02	19.02
120	12.10	16.08	21.34	23.4	25.88	25.84
180	15.50	19.86	25.38	27.18	31.50	30.50
240	18.06	22.72	28.48	30.60	33.68	33.68
300	19.08	24.90	30.86	32.78	36	36.22
360	21.40	26.54	32.58	34.94	36.22	38.28
420	22.94	27.90	34.38	36.48	40.10	40.10
480	24.00	29.18	35.58	37.58	41.52	41.5
540	24.78	30.14	36.48	38.88	42.68	42.68
600	25.42	30.7814	37.28	39.9	43.16	43.6

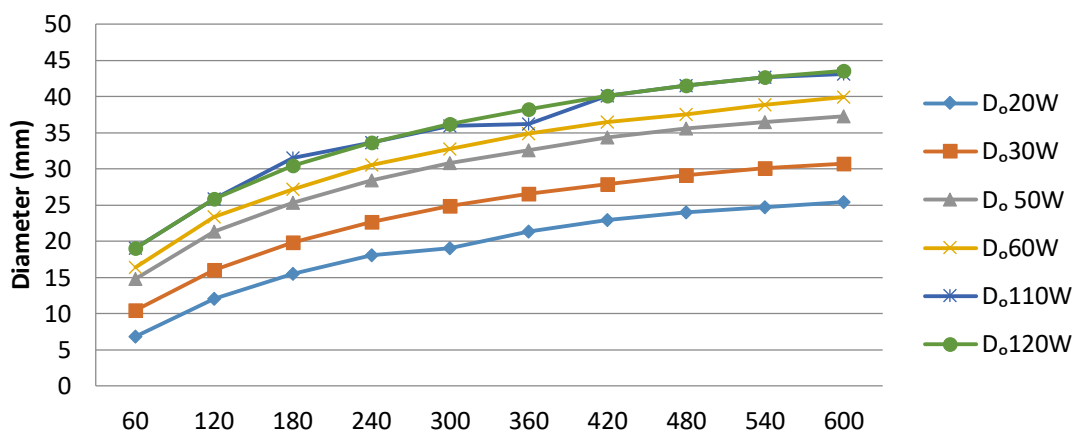


Figure 3. Diameter against time for antenna with water cooled unit

- The graph above shows that as the time increases, the ablation diameter increases, with respect to power from 20 -120W, but the diameter at each power is reduced because of the water cool effect.
- The graph also shows that as the time increases from 60s to 600s the ablation diameter increases.

Discussion

The study compared the result gotten from using a closed loop water cooled monopole microwave antenna with the same monopole antenna without a water cool system. The difference between the loop microwave antennas used in this study and other thermal ablation arrays (multiple prong RF electrodes) involves the ability to completely encircle a tumor with the loop antennas, which effectively creates a cage in which the tumor is entrapped. This has the advantage of providing precise targeting of a specific area for thermal destruction while minimizing collateral damage (Shock, 2004).

Considering the result for computer simulation with cooling unit, the diameters gotten for 20w from 60s – 600s gave a high percentage increase of 246%, this showed that ablation diameter

increased rapidly with respect to time. Also, the percentage increment in power, from 20w-120w, from 60s -20w to 600s -120w showed 455.6%, this as well portrayed that diameter increased with increase in power. Similar increment was found in antenna length, considering 20w at 60s – 600s, the increase gave 119.3%, as the power increased, from 20w to 120w, there was high increment from 20w -60s to 120w – 600s, the percentage increment value was 199.7%. For the water cool, in the result gotten for 20watt for 60s-600s, there was an increment of 272% in diameter, the length also showed an increment of 110%. As the power increases from 20w to 120w there was an increase of 539% in length and 194% in diameter. Using data analysis for the result obtained without water cool, the mean standard deviation gotten for 20w was 26.88 ± 6.78 , at 30w the mean standard deviation was 26.878 ± 6.78 , at the highest power, 120w the mean standard deviation was 38.70 ± 6.78 . It was observed that the standard deviation remains the same (6.78). Also, the result gotten from the water-cooled simulation (4.14), at 20w from 60s to 600s the mean standard deviation was 19 ± 6.05 and at 30w the mean standard deviation was 23.86 ± 6.05 , at the highest power,

120w, the mean standard deviation was 35.14 ± 6.05 , showing that the standard deviation remains the same. The reflection coefficient for simulation without water cool was -17.0882dB, which was the same for all the powers, water cool simulation also

showed the same reflection coefficient (-3.1436dB) for all the powers.



Figure 4. Represents experimental simulation without water cool for 5mins with 60W, the length was 5.8cm, the diameter 5cm and the aspect ratio was 0.862.



Figure 5. Represents experimental work with water-cool 60w at 5mins, the diameter was 4.8cm, the ablated length was 5.5 and the aspect ratio was 0.87.

Comparing the two antennas, antenna without water cooling system has increased diameter and length than antenna with water cooling system. Starting with the lowest watt (20w), at 5mins the diameter decreased by -17.2%, the length decreased by -32.9% and aspect ratio for the two antennas increased by 23.40%. For medium power (60w), at 5mins, the diameter decreased by -9.89%, length decreased by -37.9%, and aspect ratio decreased by 45.24%. The diameter for highest watt (120w), at 5mins, showed a percentage decrease of -13.3%, the lengths for the same watt at the same 5mins showed a percentage decrease of -38.2% and the aspect ratio showed a percentage increase of 40.5%. In the experimental ablation was carried out at 60w and 120w for 5minutes and 10minutes for antenna without water cool and antenna with water cool respectively (Figure 4 – 5), the result as well showed that ablation length and diameter increased with time and power. Using paired sample t-test, the P-values gotten from diameters for low power without water cool and water cool for (20W-30W) were, 0.335 and 0.001 respectively, showing no statistically significant change in diameters for water cooled but significant change in diameters with water cool. There was significant change in diameter of medium power, p-value = 0.001 in both cases. In high power, both simulations showed no significant difference in the diameters. The p values gotten from length for low power showed no significant difference for simulation without cooling unit $p = 0.040$ but showed significant difference for water cool, $p = 0.001$. In medium power, simulation without cooling unit showed significant difference in length, $p = 0.001$, why water cooled showed no significant difference, $p = 0.646$. There was no significant difference in simulation lengths of high power in both water cool and non-water cool.

This study is similar to another work on evaluation of the clinical implementation of triangular and spherical designs for simultaneous multiple-

antenna ablation of human hepatocellular carcinoma (HCC) with a recently engineered microwave coagulation system. The diameters gotten during the study were 16.7, 51.7, and 54.3cm in 3, 5–10minute ablation cycle. It was observed that the ablation with the longest time yielded the most uniformly round ablation shape (Yu et al, 2006).

It as well shared the same sentiment with another research on investigation of the result of microwave heating near large vasculature using coupled fluid-flow and thermal analysis, it was observed that low-flow conditions could cause cytotoxic heating and, therefore, vessel thrombosis and endothelial damage of downstream tissues. This is similar to this study, the effect of water cool antenna was shown in Figure 1, it was observed tissue without water cool could produce high ablation length and diameter, resulting to backward heating, hence, causing endothelial damage (Chiang et al., 2012). Such conditions might be more prevalent in patient with severe cirrhosis or compromised blood flow. High-flow conditions create the more familiar heat-sink effect that could protect perivascular tissues from the intended thermal damage.

References

- Açıkgoz, H., Türer. İ., 2014.** A Novel Microwave Coaxial Slot Antenna for Liver Tumor Ablation. *Advanced Electromagnetics*, 2014; 3(1): 20-15.
- Bertram, J.M., Yang, D., Converse, M.C., Webster, J.G., Mahvi, D.M., 2006.** A Review of Coaxial-Based Interstitial Antennas for Hepatic Microwave Ablation. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 2006; 34(3):187–213.
- Chiang, J., Hynes, K., Brace. CL., 2012.** Flow-Dependent Vascular Heat Transfer during Microwave Thermal Ablation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2012 August; 2012: 5582–5585. doi:10.1109/EMBC.2012.6347259.

Hinshaw, J.L., Lubner, M.G., Ziemlewicz, T.J., Lee, F.T., Jr, Brace, C.L., 2014. Percutaneous tumor ablation tools: Microwave, radiofrequency, or cryoablation—What should you use and why? 2014; 35:1344–1362 Doi: 10.1148/rg.345140054.

Kaur, S., Maini, S., 2007. Ablation Options for Treatment of HCC - MWA and RFA. International Journal of Emerging Technologies in Computational and Applied Sciences (IJETCAS) 2279-0047; 2007:2279-0055.

Lin, J.C., Wang, Y.J.; 1996. “The cap-choke catheter antenna for microwave ablation treatment” IEEE Trans Biomed Eng. 1996;43(6):657-60.

Shock, S.A., Meredith, K., Warner, T.F., Sampson, L.A., Wright, A.S., Winter III, T.C.,

Mahvi, D.M., Fine, J.P., Lee, F.T., 2004. Microwave Ablation with Loop Antenna: In Vivo Porcine Liver Model. Radiology 2004; 231:143–149. Doi: 10.1148/radiol.2311021342.

Simon, C.J., Dupuy, D.E., Mayo-Smith, W.W., 2005. Microwave Ablation: Principles and Applications. Radio Graphics 2005; 25: S69–S83. Doi: 10.1148/rg.25si055501.

Yu, N.C., Lu, D.S.K., Raman, S.S., Dupuy, D.E., Simon, C.J., Lassman, C., Iaswad, B., Ianniti, D., Busuttill, R.W., 2006. Hepatocellular Carcinoma: microwave ablation with multiple straight and loop antenna clusters pilot comparison with pathologic findings. Radiology 2006; 239:269–275. Doi: 10.1148/radiol.2383041592

Sepsisli Neonatal Buzağlarda Bazı hematolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması

Investigation of Some Hematologic and Biochemical Parameters in Neonatal Calves with Sepsis

Yasemin BEYDİLLİ*¹ Halil İbrahim GÖKÇE²

¹Mehmet Akif Ersoy University, Agriculture, Livestock and Food Research and Application Center, Burdur, Turkey

²Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Burdur, Turkey

Öz: Çalışmanın amacı sepsisli neonatal buzağlarda hematolojik ve biyokimyasal değişimlerin araştırılmasıdır. Çalışmada, 20 adet sepsisli ve 10 adet klinik olarak sağlıklı neonatal buzağı kullanıldı. Bütün buzağlar monitörize edildi ve pulse oksimetre ile oksijen saturasyonları (SpO₂) ölçüldü. Çalışmada yer alan tüm buzağların hematolojik ve biyokimyasal analizleri yapıldı. Çalışmada sepsisli buzağların vücut ısısı (p<0.001) ve SpO₂ (p<0.01) değerleri düşük, solunum sayılarının (p<0.01) ise kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi. Sepsisli buzağların total lökosit (WBC, p<0.001), monosit (MID, p<0.001), granülosit (GRA, p<0.01), ortalama korpuskuler volüm (MCV, p<0.01), ortalama korpuskuler hemoglobin (MCH, p<0.001) ve ortalama korpuskuler hemoglobin konsantrasyonu (MCHC, p<0.01) düzeyleri kontrol grubu değerlerine göre yüksek bulundu. Ayrıca sepsisli buzağların total bilirubin (T.BİL, p<0.01), direkt bilirubin (D.BİL, p<0.001), üre (ÜRE, p<0.001), kreatinin (KREA, p<0.001), aspartat aminotransferaz (AST, p<0.01) ve laktat dehidrojenaz, p<0.001) değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptanırken total protein (TP, p<0.01), albümin (ALB, p<0.001) ve immunoglobulin (Ig, p<0.001) düzeylerinde ise önemli düzeyde düşüşler belirlendi. Yatar pozisyonunda olan sepsisli (şiddetli) grupta ayakta olan (orta derecede) sepsisli buzağlara göre daha çok sayıda buzağda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde değişimler belirlendi. Sonuç olarak sepsis neonatal buzağlarda önemli hematolojik ve biyokimyasal değişimlere neden olmakta ve kalp, karaciğer ve böbrekler gibi organların fonksiyonlarını negatif yönde etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyokimya, Buzağı, Hematoloji, Monitörizasyon, Sepsis.

Abstract: The aim of the present study was to investigate alterations of hematologic and biochemical parameters in neonatal calves with sepsis. In the present study, 20 neonatal calves with sepsis and 10 clinically healthy neonatal calves were used. All the calves were monitored and blood oxygen saturation level (SpO₂) was measured by using a pulse oxymeter. Hematologic and biochemical analysis were also applied to the calves. In the study, body temperature (p<0.001) and SpO₂ levels (p<0.01) were low and respiratory rates (p<0.01) were high in calves with sepsis compared to those of control group. Total leucocytes (WBCs, p<0.001), monocytes (MID, p<0.001), granulocytes (GRA, p<0.01), mean corpuscular volume (MCV, (p<0.01), mean corpuscular hemoglobin (MCH, p<0.001) and mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCHC, p<0.01) were significantly higher in calves with sepsis than that of obtained from control group. In addition to these, total bilirubin (T.BIL, p<0.01), direct bilirubin (D.BIL, p<0.001), urea (URE, p<0.001), creatinin (CREA, p<0.001), aspartate aminotransferase (AST, p<0.01) and lactate dehydrogenase (LDH, p<0.001) levels were significantly high in calves with sepsis compared to those of control group. Whereas, total protein (TP, p<0.01), albümin (ALB, p<0.001) and immunoglobulin (Ig, p<0.001) were significantly lower in calves with sepsis than that of obtained from control group. In the study, the number of calves, having alterations in hematologic and biochemical parameters were higher in lying calves (with severe sepsis) than standing calves (with moderate sepsis). In conclusion, sepsis causes important hematologic and biochemical alterations and affects heart, liver and kidneys functions negatively in neonatal calves.

Keywords: Biochemistry, Calves, Hematology, Monitorization, Sepsis.

*Corresponding author : Yasemin BEYDİLLİ

e-mail : ybeydilli@mehmetakif.edu.tr

Geliş tarihi / Received : 09.09.2019

Kabul tarihi / Accepted: 08.10.2019

Introduction

Neonatal dönemde buzağlarda gelişen enfeksiyonlar yetişkin hayvanlara göre çok daha hızlı oluşmakta ve daha ciddi komplikasyonlarla sonuçlanmaktadır (Fecteau ve ark., 1997, Fecteau ve ark., 2009, Şen ve ark., 2013, Cho ve Yoon, 2014, Smith, 2015, Bedenice ve ark., 2016, Poulsen ve ark., 2010, Pardon ve Depres, 2018). Enfeksiyonlar sonucu gelişen sepsisin yeterince şiddetli ve uzun sürmesi durumunda da dolaşimsal, hücrel ve metabolik bozukluklarla karakterize septik şok gelişmektedir. Septik şok; merkezi sinir sistemi, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, kardiovasküler sistem ve hepatik sistem gibi birçok sistemin fonksiyonlarının bozulmasına ve çoklu organ yetmezliğinin gelişmesine neden olmaktadır. Çoklu organ yetmezliği ise sepsisin son aşaması olup çoğunlukla geri dönüşümsüzdür ve ölüm ile sonuçlanmaktadır (House ve ark., 2008, Angus ve van der Poll 2013, Şen ve ark., 2013, Thomas 2014, Constable ve ark., 2016, Al-Khafaji ve Pinsky 2017).

Buzağlarda neonatal dönemde sepsis ve sepsisin, organ ve sistemler üzerine yapmış olduğu bozukluklar ve bunların teşhisine yönelik çalışmalar oldukça yetersizdir. Sepsis olgularında tedavideki başarı; yıkımların geri dönüşümsüz olmadan erken teşhisine ve tedavisine başlanmasına dayanır. Neonatal buzağlarda sepsisin hematolojik ve biyokimyasal

parametreler ile birlikte organ veya sistemler üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar son derece yetersizdir. Bu çalışmada sepsisli neonatal buzağlarda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen veriler ışığında gelişen organ veya sistem bozukluklarının belirlenmesi de hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali

Bu araştırmanın materyalini Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Büyük Hayvan Kliniğine getirilen yaşları 1-30 gün arasında değişen 20 sepsis şüpheli (Deneme grubu) ve bir süt sığırı işletmesinde bulunan ve aynı yaş grubunda, klinik olarak sağlıklı 10 buzağı (kontrol grubu) oluşturmaktadır.

Neonatal buzağlarda sepsis kriterleri tam olarak belirlenemediğinden, çalışmada kullanılan sepsis kriterleri buzağlarda yapılan çalışmalardan uygun şekilde modifiye edilerek oluşturulmuştur (Fecteau ve ark., 1997, Şen ve ark., 2013, Başoğlu ve ark., 2014, Cho ve Yoon, 2014, Constable ve ark., 2016). Çalışmada sepsisli buzağların belirlenmesinde aşağıdaki sepsis kriterleri kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Neonatal Buzağlarda Sepsis Kriterleri

Kriter	Sonuç
Rektal ısı (°C)	>39, <36
Kalp frekansı (x/dk)	>160, <100
Solunum sayısı (x/dk)	>45
SpO ₂ (%)	<90
MAP (mmHg)	<65
Total lökosit (x/µl)	>12000, <4000

SpO₂: arteriyel kan oksijen saturasyonu, MAP: ortalama arteriyel kan basıncı.

Klinik Muayeneler

Kliniğe getirilen ishali buzağuların anemnez bilgileri alınarak rutin klinik muayeneleri yapıldı ve en az iki sepsis kriterine sahip olan buzağular (deneme grubu) hayvan sahibinin onamı alınarak çalışmaya dahil edildi. Buzağuların rektal ısı, kalp frekansı, solunum sayısı, dehidrasyon durumu, emme refleksi, mukozaların durumu, çevreye ilgi, ayakta veya yatıyor oluşu ve dışkılama durumu gibi klinik bulgular belirlenerek kayıt altına alındı. Buzağular monitörize edilerek (BM5vet Ltd. G. Kore) sistolik kan basıncı (SKB), diyastolik kan basıncı (DKB), ortalama arteriyel kan basıncı (MAP) ve pulse oksimetre ile de oksijen saturasyonu (SpO₂) ölçüldü. Klinik bulgulara göre en az iki sepsis kriteri taşıyan, emme refleksi olan veya azalmış, ayakta ve dehidrasyon derecesi %5-%6 aralığında olan buzağular ayakta olan grup (orta derecede şiddetli sepsisli, n=6) olarak kabul edildi. Yatar pozisyonda olan, depresif, emme refleksi azalmış veya tamamen kaybolmuş, dehidrasyon derecesi %8-%10 civarında olan ve en az iki sepsis kriteri taşıyan buzağular ise yatar pozisyonda olan grup (şiddetli derecede sepsisli, n=14) olarak kabul edildi.

Laboratuvar Muayeneleri

Kan örneklerinin alınması

Bütün gruplardan tedavi öncesi *Vena jugularis*'ten kan örnekleri K₃EDTA'lı ve aktivatörlü jelli antikoagulanlı tüplere alındı (BD vacutainer, İNGİLTERE). K₃EDTA'lı kan örnekleri 15 dk içinde hemogram ölçümü için, antikoagulanlı kan örnekleri ise serum elde etmek için kullanıldı.

Hemogram

Sepsisli ve kontrol grubunda yer alan buzağulara ait K₃EDTA'lı venöz kan örneklerinde rutin hemogram parametreleri tam kan sayım cihazı ile belirlendi (Abacus Junior Vet, Diatron MI Ltd. MACARİSTAN).

Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Serum total protein (TP), albumin (ALB), total bilirubin (T.Bil), direkt bilirubin (D.Bil), kan üre

nitrojen (BUN), kreatinin (KREA) düzeyleri ve laktat dehidrojenaz (LDH), aspartat alanin aminotransferaz (AST), gammaglutamyl transferaz (GGT), alkalın fosfataz (ALP) aktiviteleri fotometrik yöntemlerle (Abbott Architect Ci8200 Biyokimya cihazı, ABD) ölçüldü. İmmunoglobulin (Ig) düzeyleri her hayvan için belirlenen total protein değerinden albümin değerinin çıkarılması ile belirlenirken, indirekt bilirubin (İ.BİL) ise total bilirubinden direkt bilirubinin çıkarılması ile hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin normal dağılımı Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılım gösteren parametrelerden sepsisli ve kontrol gruplarına ait veriler arasındaki istatistiksel anlamlar bağımsız t test ile, ayakta duran, yatan sepsisli ve kontrol grubu buzağulara ait parametreler arasındaki farklılıklar ise One Way Anova (posthoc Duncan) ile değerlendirildi.

Çalışmada sepsisli buzağularda analiz edilen parametrelerdeki bireysel artış veya azalışları belirlemek için her parametre için kesim noktası (cut-off) değeri oluşturuldu. Bunun için kontrol grubu buzağulardan elde edilen parametrelerin ortalama değerlerine o parametrenin 2 standart sapması eklenerek artışlar veya çıkarılarak düşüşler için kesim noktası (cut-off) oluşturuldu. Her parametre için belirlenen kesim noktasının üzerinde olan değerler o hayvan için artış, altında olan değerler ise yine o hayvan için düşüş olarak kabul edildi (Knowles ve ark., 2000, Sing ve ark., 2006, Rastowici ve ark., 2011).

Bulgular

Sepsisli buzağuların yapılan klinik muayenesinde rektal ısılarının (37.32±1.49°C) kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi (p<0.001, Tablo 2). Sepsisli grupta yer alan 4 (%20) hayvanın rektal ısılarının 36°C'nin altında olduğu yani hipotermik olduğu (en düşük 33.7°C) belirlendi. Sepsisli buzağulardan 2 tanesi hipertermik (en yüksek 40°C) (>39°C) iken geri kalan 14 buzağının ise rektal ısılarının sepsis kriterleri dışında olduğu (<39°C, T>36°C) saptandı (Tablo 2). Sepsisli buzağuların

kalp frekansları ile kontrol grubu buzağuların değerleri karşılaştırıldığında bazı hayvanlarda artışın bazı hayvanlarda ise düşüşün olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. Bununla birlikte sepsisli grupta yer alan 5 (%25) hayvanın kalp atım sayısının (atım<100/dk) düşük olduğu ve en düşük 72 atım/dk olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Sepsisli buzağularda solunum sayısının (47.8 ± 17.83 /dk) kontrol grubu değerlerine göre anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0.001$). Sepsisli grupta yer alan buzağulardan 10 (%50) hayvanın solunum sayısının artmış (>45/dk) olduğu ve en yüksek değer 92/dk olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Sepsisli buzağuların ortalama SpO₂ değerinin 86.25 ± 7.95 olduğu ve kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Sepsisli buzağularda SpO₂ değerlerinin bazı hayvanlarda düştüğü bazı hayvanlarda ise normal seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Bu hayvanlardan 13 (%65) tanesinde SpO₂'nin <%90 olduğu ve en düşük değer 71 olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Çalışmada yer alan sepsisli buzağuların SKB, DKB ve MAP değerlerinin kontrol grubundan farklı

olmadığı saptanmış olup en düşük ve en yüksek değerleri arasında ise büyük farklılıklar olduğu görülmüştür. Ayrıca sepsisli buzağulardan 3 (%15) tanesinde MAP'ın <65 mmHg olduğu ve en düşük değer 53 mmHg olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Çalışmada yatan ve ayakta duran sepsisli buzağuların klinik bulguları değerlendirildiğinde, yatan sepsisli buzağularda dehidrasyon derecesinin (8.33 ± 1.49) ayakta duran buzağulardan (5.5 ± 0.54) daha yüksek olduğu ($p<0.01$) saptanırken yatan buzağuların rektal ısılarının ($36.7\pm 1.14^{\circ}\text{C}$) ise ayakta duranlara ($38.86\pm 0.88^{\circ}\text{C}$) göre daha düşük olduğu ($p<0.01$) belirlenmiştir. Yatan ile ayakta duran sepsisli buzağuların, solunum sayısı, MAP ve SpO₂ değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, bu parametrelerin yatan hayvanlarda daha çok sayıda hayvanda değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada yatan sepsisli grupta hayvanların solunum sayısı artışı %57'sinde, SpO₂ düşüşü %78'inde ve MAP düşüşü ise %21'inde belirlenmiştir. Ayakta duran buzağularda ise solunum sayısı artışı hayvanların %33'ünde, SpO₂ düşüşü %33'ünde belirlenirken, MAP değerleri ayakta duran tüm sepsisli buzağularda kontrol grubunun değerlerine yakın olarak elde edilmiştir.

Tablo 2. Sepsisli ve kontrol grubu buzağuların klinik bulguların karşılaştırılması, (Ortalama±Standart sapma)

Parametreler	Kontrol Grubu (n:10)	Sepsisli Grup (n:20)	En düşük - En yüksek	p değeri
Yaş (gün)	11.5±6.34	10.3±7.86	1-30	
Rektal ısı (°C)	39.7±0.37	37.32±1.49	33.6-40	0.0001
Solunum sayısı (x/dk)	36.9±4.67	47.8±17.83	22-92	0.017
Kalp frekansı (x/dk)	124.4±21.11	110.52±23.14	72-156	0.120
SKB (mmHg)	149±14.51	144.44±34.43	77-202	0.629
DKB (mmHg)	92±19.68	97.61±33.6	41-181	0.582
MAP (mmHg)	111±16.06	113.22±32.56	53-137.66	0.811
SpO ₂ (%)	93.3±3.4	86.25±7.95	71-99	0.002
Dehidrasyon (%)	0	7.4±1.78	5-10	

SKB: sistolik kan basıncı, DKB: diyastolik kan basıncı, MAP: ortalama arteriyel kan basıncı, SpO₂: satüre arteriyel oksijen

Hemogram Bulguları

Sepsisli buzağuların WBC ($p<0.01$), MID ($p<0.001$), GRA ($p<0.01$), %MID ($p<0.001$), MCV ($p<0.01$), MCH ($p<0.001$), MCHC ($p<0.01$) değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Sepsisli buzağulardan 14 (%70) tanesinde lökositoz ($>12000/\mu\text{l}$)

belirlenirken 2 (%10) buzağıda lökopeni ($<4000/\mu\text{l}$) belirlenmiştir.

Çalışmada ayakta duran sepsisli buzağuların WBC değerlerinin ($22.14\pm 7.79 \times 10^9/\text{L}$) yatan grubun değerlerinden ($14.89\pm 9.35 \times 10^9/\text{L}$) daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.01$). Ayakta ve yatan pozisyonda duran sepsisli buzağuların diğer hematolojik parametrelerinin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 3. Sepsisli ve kontrol grubu buzağuların hemogram bulguları (Ortalama \pm Standart sapma)

Parametreler	Kontrol Grubu (n:10)	Sepsisli Grup (n:20)	En düşük - En yüksek	p değeri
WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	10.35 \pm 1.09	17.56 \pm 9.82	1.32-38.96	0.004
LYM ($\times 10^9/\text{L}$)	6.02 \pm 1.45	5.93 \pm 2.44	1.3-9.98	0.0902
MID ($\times 10^9/\text{L}$)	0.13 \pm 0.12	0.80 \pm 0.49	0.02-1.81	0.0001
GRA ($\times 10^9/\text{L}$)	4.19 \pm 1.41	10.2 \pm 8.27	0.67-30.28	0.005
LYM (%)	58.34 \pm 14.10	40.63 \pm 15.57	19.9-89.4	0.005
MID (%)	1.09 \pm 0.42	5.41 \pm 2.68	0.6-9.8	0.0001
GRA (%)	40.58 \pm 13.83	51.2 \pm 19.96	6.9-77.7	0.102
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	8.19 \pm 1.08	8.12 \pm 2.0	4.71-12.36	0.906
HGB (g/dl)	8.14 \pm 1.08	9.3 \pm 2.39	4.7-132.7	0.079
HCT (%)	28.01 \pm 3.45	30.55 \pm 7.5	13.45-42.37	0.216
MCV (fl)	34.2 \pm 2.65	37.92 \pm 3.70	29-46	0.004
MCH (pg)	9.96 \pm 0.59	11.49 \pm 0.97	9.4-13.2	0.0001
MCHC (g/dl)	29.06 \pm 1.16	30.44 \pm 1.76	27.8-34.9	0.017
RDWc (%)	27.54 \pm 2.17	26.7 \pm 3.72	21.3-35.4	0.443
PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	559.4 \pm 157.98	512.45 \pm 182.74	70-1163	0.475

WBC: total lökosit, LYM: lenfosit, MID: monosit, GRA: granulosit, RBC: eritrosit, HGB: hemoglobin, HCT: hemotokrit, MCV: alyuvar ortalama çapı, MCH: ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, RDWc: eritrosit dağılım hacmi, PLT: trombosit

Biyokimyasal Bulgular

Sepsisli buzağuların T.BİL ($p<0.02$), D.BİL($p<0.001$), ÜRE ($p<0.001$), KREA ($p<0.001$), AST ($p<0.01$) ve LDH ($p<0.001$) değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışlar belirlenirken; TP ($p<0.01$), ALB ($p<0.001$), Ig ($p<0.001$) değerlerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüşler belirlenmiştir (Tablo 4). Sepsisli buzağulardan 14 (%70) tanesinin TP değerinin kesim noktası olan

5.71g/dl'nin altında (%50'si $<2g/dl$) olduğu ve 11 tanesinin (%55) Ig değerinin kesim noktası olan 3.26g/L'nin altında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hesaplanan kesim noktaları dikkate alındığında 11 (%55) sepsisli buzağıda ALB düzeyi düşük olarak belirlenirken, yine T.BİL, D.BİL, İ.BİL, ÜRE, KREA, AST, LDH ve ALP değerlerinde sırası ile 13 (%65), 12 (%60), 8 (%40), 14 (%70), 18 (%83), 14 (%70), 14 (%70) ve 6 (%30) sepsisli buzağıda yükselişler saptanmıştır.

Tablo 4. Sepsisli ve sağlıklı buzağuların biyokimyasal bulguları (Ortalama \pm Standart sapma).

Parametreler	Kontrol Grubu (n:10)	Sepsisli Grup (n:20)	En düşük- En yüksek	p değeri
TP (g/dl)	6.81 \pm 0.55	5 \pm 1.55	2.6-9.5	0.0001
ALB (g/dl)	2.33 \pm 0.21	1.83 \pm 0.38	1-2.5	0.0001
Ig (g/dl)	4.48 \pm 0.61	3.16 \pm 1.24	1.4-7.1	0.001
T.BİL (mg/dl)	0.15 \pm 0.02	0.48 \pm 0.57	0.08-2.06	0.02
D.BİL (mg/dl)	0.07 \pm 0.03	0.17 \pm 0.09	0.03-0.43	0.0001
İ.BİL (mg/dl)	0.08 \pm 0.02	0.3 \pm 0.51	0.01-1.79	0.072
ÜRE (mg/dl)	26.21 \pm 5.13	97.85 \pm 76.42	18-256	0.0001
KREA (mg/dl)	0.58 \pm 0.04	2.27 \pm 1.85	0.27-7.24	0.001
GGT (U/L)	299.2 \pm 199.2	278.8 \pm 358.36	27-1543	0.843
AST (U/L)	31.3 \pm 7.11	114.65 \pm 103.78	23-433	0.002
LDH (U/L)	508.18 \pm 77.29	1002.5 \pm 518.61	413-1995	0.0001
ALP (U/L)	190.2 \pm 45.48	299.8 \pm 270.44	59-1213	0.092

TP: total protein, ALB: albumin, T.BİL: total bilirubin, D.BİL: direkt bilirubin, ÜRE: kan üre, CREA: kreatinin, LDH: laktat dehidrojenaz, AST: Aspartat alanine animotransferaz, GGT: Gammaglutamyl transferase, ALP: Alkaline fosfataz, Ig: Immunoglobulin.

Ayakta duran ve yatar durumda olan sepsisli buzağuların analiz edilen biyokimyasal parametrelerinin kendi aralarında anlamlı düzeyde farklı olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte analiz edilen biyokimyasal parametreler için

oluşturulan kesim noktası (cut-off) değerleri dikkate alındığında yatan durumda olan sepsisli grupta ayakta olanlara göre daha çok sayıda hayvanda bu parametrelerde değişim olduğu belirlenmiştir. Ayakta duran sepsisli buzağuların

TP, ALB, Ig değerlerinde sırası ile 3 (%50), 3 (%50), 2 (%33) buzağıda düşüşler belirlenirken, yatar durumda olan sepsisli grupta ise TP, ALB ve Ig değerlerinde sırası ile 11 (%78), 8 (%57) ve 9 (%64) buzağıda düşüşler saptanmıştır. Ayrıca ayakta duran sepsisli buzağuların T.BİL 5 (%83), D.BİL 3 (%50), İ.BİL 4 (%66), ÜRE 5 (%83), KREA 5 (%83), AST 3 (%50), LDH 3 (%50) ve ALP değerlerinde 1 (%16) buzağıda artışlar saptanmıştır. Buna karşın yatar durumda olan sepsisli buzağuların T.BİL, D.BİL, İ.BİL, ÜRE, KREA, AST, LDH ve ALP değerlerinde sırası 8 (%57), 9 (%64), 5 (%35), 11 (%78), 13 (%93), 12 (%85), 11 (%78) ve 5 (%35) buzağıda artışlar belirlenmiştir.

Tartışma

Buzağılarda neonatal dönem çok kritik bir dönem olup bu dönem buzağular için fizyolojik fonksiyonların geliştiği ve doğum sonrası hayata adapte olduğu bir dönemdir. Buzağuların immun sistemleri henüz gelişmediği için enfeksiyöz etkenlere karşı korunmasız olarak doğarlar ve bu dönemde bakteriyel, viral ve paraziter patojenlere daha kolay maruz kalırlar (House ve ark., 2008, Poulsen ve ark., 2010, Başoğlu ve ark., 2014, Smith, 2015, Bedenice ve ark., 2016, Constable ve ark., 2016). Buzağılarda neonatal dönemde gelişen hastalıklar arasında sindirim sistemi hastalıkları ve özellikle neonatal ishaller önemli bir yer tutmaktadır (Fecteau ve ark, 2009, Pardon ve Depres, 2018,). Gelişen enfeksiyon sonucu bakteriyemi veya viremi şekillenerek sistemik yangıya yani sepsise neden olmaktadır. Sepsisin yeterince şiddetli ve uzun sürmesi durumunda da septik şok ve daha sonra da çoklu organ yetmezlikleri gelişmekte ve bu aşamadan sonra da genellikle ölüm ile sonlanmaktadır (Merx ve Weber, 2007, House ve ark., 2008, Fecteau ve ark., 2009, Angus ve van der Poll 2013, Şen ve ark., 2013, Cho ve Yoon 2014, Gasparavic ve ark., 2014, King ve ark, 2014, Osterbur ve ark., 2014, Thomas 2014, Bedenice 2016, Constable ve ark., 2016, Al-Khafaji ve Pinsky,2017, Pardon ve Depres, 2018,). Sepsis ilerledikçe organizmada gelişen hasar daha büyük olmakta bu durum tedaviyi güçleştirmekte hatta imkansız hale

getirmektedir. Bu nedenle sepsiste komplikasyonların belirlenmesi, erken teşhis ve tedavi edilmesi hastanın yaşama şansını da arttırmaktadır. Bununla birlikte günümüzde hem insanlarda hem de hayvanlarda sepsis ve sonrasında gelişen komplikasyonlara bağlı ölüm oranları hala yüksek seyretmekte olup ciddi bir problem olarak önemini korumaktadır (Martin ve ark., 2003, Vincent ve ark., 2006, Osterbour ve ark., 2014). Sepsiste gelişen klinik bulguların değişken olması nedeniyle buzağılarda sepsis kriterlerini koymak oldukça güçtür (Fecteau ve ark., 1997, Lofstedt ve ark., 1999, Şen ve ark., 2013, Constable ve ark., 2016, Pardon ve Depres, 2018). Bu konuda yapılan çalışmalarda ön plana çıkan klinik sepsis kriterleri arasında dehidrasyon, depresyon, skleral damarlarda dolgunluk, emme refleksi kaybı, anormal rektal ısı, taşikardi, taşipne, hipovolemi, hipotansiyon, düşük %SPO₂ ve MAP ve lokal enfeksiyon varlığı gibi bulgular yer almaktadır (Lofstedt ve ark., 1999, Pardon ve Depres, 2018). Bununla birlikte Fecteau ve ark (1997) tarafından sepsisli buzağılarda yapılan bir çalışmada rektal ısı, solunum sayısı ve kalp frekansı normal bulunurken bir başka çalışmada ise buzağılarda hipotermi ve taşipne rapor edilmiştir (Lofstedt ve ark., 1999).

Yapılan mevcut çalışmada rektal ısı, mukozalar, genel durum, emme refleksi, dehidrasyon, kalp frekansı ve solunum sayısı dikkate alındığında sepsisli buzağılarda saptanan semptomların oldukça değişken olduğu görülmektedir (Tablo 2). Buzağuların bir kısmında klinik semptomlar daha hafif seyrederken bir kısmında daha şiddetli seyrettiği belirlenmiştir. Bu hayvanların bazılarında depresyon, yerde yatma, emme refleksinde azalma veya kaybolma, iştahsızlık, mukoz membranlarda hiperemi veya solgunluk, hipotermi veya hipertermi, taşikardi, solunum sayısında artış ve %5'den %10'a kadar değişen dehidrasyon derecesi belirlenmiştir (Tablo 2). Sepsisli buzağuların %SpO₂ değerleri ve rektal ısıları kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuş olup, bu bulgular sepsisli buzağılarda rapor edildiği gibi solunumun sayısının artışı ile birlikte akciğerlerin vital kapasitesinin düştüğünü göstermektedir (Lofstedt ve ark., 1999, Poulsen ve ark., 2010,

McGirk, 2011, Bednarski ve ark., 2015, , Smith 2015, Bedenici 2016, Constable ve ark., 2016, Pardon ve Depres, 2018). Yapılan çalışmada sepsisli buzağların MAP, SKB ve DKB değerlerinin ise kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 2). Çalışmada hesaplanan kesim noktası (cut-off) değerleri dikkate alındığında buzağların bazılarının değerlerinde azalış, bazılarında artış bazılarında ise normal değerlerin belirlendiği görülmüştür. Elde edilen bireysel düzeyde farklı sonuçların sepsisin etiyojisi, şiddet ve sürecine bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca bazı sepsisli buzağlarda belirlenen %SpO₂ düzeyinde ve MAP değerindeki düşüşlerin muhtemel nedenleri arasında da dehidrasyona bağlı gelişmiş olan hipovolemi, hipotansiyon, hipoksi ve daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan kalp fonksiyonlarının baskılanması da etkili olabilir (Lofstedt ve ark., 1999, Poulsen ve ark., 2010, McGirk, 2011, Bednarski ve ark., 2015, Smith 2015, Bedenici 2016, Constable ve ark., 2016, Pardon ve Depres, 2018). Çalışmada ayrıca yatan (şiddetli derecede) sepsisli buzağlarda ayakta duran (orta derecede) sepsisli buzağlara göre daha fazla sayıda hayvanda emme refleksinin kaybolduğu, dehidrasyon derecesinin daha yüksek, buna karşın rektal ısının ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yatar pozisyonda olan sepsisli buzağlarda hastalığın ayakta olan sepsisli buzağlara göre klinik olarak daha şiddetli seyrettiği söylenebilir. Bununla birlikte sepsisli buzağların neonatal dönemde olmakla birlikte yaşlarının da 1 gün ile 30 gün arasında değiştiği saptanmış ve bu çalışmada sepsisin etiyojisi belirlenmemiştir. Bu nedenle klinik semptomlardaki farklılıkların çalışmaya dahil edilen buzağların farklı hastalık evrelerinde, farklı yaş gruplarında olmasının yanında sepsise neden olan etiyojinin farklılığından da kaynaklanabileceği kanaati de oluşmuştur.

Neonatal dönemde buzağlarda yapılan çalışmalarda %HTC, HGB ve RBC değerlerinin buzağlarda doğumdan hemen sonra kısa sürede normale dönen artışlar gösterdiği, LYM, MCH, MCHC, MID değerlerinde değişimlerin olmadığı

buna karşın nötrofil ve WBC değerlerinin ise doğum sonrası 6 ile 20 gün aralığında hafif artışlar gösterdiği saptanmıştır. Buzağların doğum sonrası MCV değerinde doğumdan 13 gün sonra hafif düşüşler saptanırken PLT değerlerinde 6. günden itibaren artışlar saptanmıştır. Bununla birlikte buzağların kolostrum almasının hematolojik değerlerde değişime neden olmadığı ortaya konulmuştur (Knowles ve ark., 2000, Jezek, 2007). Sepsisli buzağlarda yapılan çalışmalarda lökositosis veya lökopeni, lenfopeni, nötrofil veya nötropeni, trombositopeni saptanırken, HGB ve RBC değerlerinde normal veya düşük değerler ve ishali olgularda %HTC değerinde artışlar saptanmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda bu parametrelerin sepsisin etiyojisi ve şiddetine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği vurgulanmıştır (Lofstedt ve ark., 1999, Pardon ve Depres, 2018). Buna karşın sepsisli buzağlarda MCH, MCHC ve MCV değerlerinde değişimin olmadığı belirlenmiştir (Poulsen ve ark., 2010, McGirk, 2011, Singh ve ark., 2014, Brar ve ark., 2015, Smith 2015, Bedenici 2016, Constable ve ark., 2016, Kumar ve ark., 2018, Pardon ve Depres, 2018, Yıldız ve ark., 2018). Mevcut bu çalışmada ise sepsisli buzağların WBC (p<0,01), MID (p<0,001), GRA (p<0,01), %MID (p<0,001), MCV (p<0,01), MCH (p<0,001), MCHC (p<0,01) değerlerinin kontrol grubu buzağların değerlerine göre anlamlı düzeylerde arttığı belirlenmiştir (Tablo 3). Sepsisli buzağlarda MCV, MCH ve MCHC, WBC, GRA değerlerinde görülen artışın muhtemel nedeni ise daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi organizmanın enfeksiyöz ajanlara karşı savunma mekanizması gereği artıştan ve dehidrasyona bağlı hemokonsantrasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Santos ve ark., 2002, Asati ve ark., 2008, Brar, 2015).

Mevcut çalışmada sepsisli buzağlardan elde edilen hemogram bulgularında bireysel farklılıklar belirlenmiş olup bu muhtemelen rapor edildiği gibi buzağlardaki yaş farkı, sepsisin etiyojisi, süreç ve şiddetinden kaynaklanmaktadır (Fecteau ve ark., 1997, Lofstedt ve ark., 1999, Pardon ve Depres, 2018). Çalışmada ayakta olan buzağlarda yatanlara göre belirlenen daha yüksek WBC değeri (p<0.01) bu hayvanlarda mevcut enfeksiyona karşı daha

güçlü bir savunmanın varlığının bir göstergesi olabilir.

Buzağlarda yapılan çalışmalar bazı biyokimyasal parametrelerin neonatal dönemde yaşa ve kolostrum alıp almamasına göre değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Kurz ve Willet, 1991, Egli ve Blum, 1998, Knowles ve ark., 2000, Lassen, 2004, Maden ve ark., 2004, Mahri ve ark., 2007, Jezek ve ark., 2006, Jezek 2007, Klinkon ve Jezek, 2012, Pekcan ve ark., 2013, Brar ve ark., 2014, Tothova ve ark., 2016, Aydoğdu ve Güzelbektaş, 2018). Kolostrum almış buzağlarda ilk günlerde serum TP, Ig, AST, GGT, ALP ve LDH seviyeleri yükseldiği daha sonra düşmeye başladığı belirlenmiştir (Kurz ve Willet, 1991, Tyler ve ark., 1998, Knowles ve ark., 2000, Muri ve ark. 2005, Jezek ve ark. 2006, Jezek 2007, Mahri ve ark., 2007, Pekcan ve ark., 2013, Tothova ve ark., 2016). Bu nedenle yapılacak biyokimyasal değerlendirmelerde buzağın yaşı ve kolostrum alıp almadığına dikkat edilmesi önerilmektedir (Knowles ve ark., 2000, Muri ve ark., 2005, Jezek ve ark., 2006, Jezek 2007, Mahri ve ark., 2007, Klinkon ve Jezek, 2012).

Serum üre konsantrasyonu alınan besine bağlı olup kreatinin ile birlikte böbrek hastalıklarını belirlenmesinde kullanılmaktadır. Buzağlarda serum üre düzeyinin artması protein yıkımlanmasının artmasını göstermekte olup aynı zamanda dehidrasyona bağlı olarak da artmaktadır (Maach ve ark., 1992, Kaneko, 1997, Santos ve ark., 2002, Kaur ve ark., 2006, Himanshu, 2010, Klinkon ve Jezek, 2012). Kreatinin ise kaslarda sentezlenmekte ve idrarla atılmaktadır. Serumdaki konsantrasyonu beslenmeye bağlı değildir. Glomerular filtrasyonun ciddi boyutta bozulduğu böbrek hastalıklarında serum düzeyi artmaktadır (Kaneko, 1997). İshalli neonatal buzağlarda yapılan çalışmalarda ise serum üre ve kreatinin seviyelerinde artışlar saptanmıştır (Santos ve ark., 2002, Himanshu, 2010, Başer ve Civelek, 2013, Singh ve ark., 2014). Yapılan mevcut çalışmada serum ÜRE ($p<0.001$) ve KREA ($p<0.001$) seviyeleri sepsisli buzağlarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 4). Yapılan çalışmada sepsisli buzağlarda aynı

zamanda %5-%10 aralığında dehidrasyon belirlenmiş olup bu değerlerdeki artış dehidrasyonda gelişen hipovolemiye bağlı olarak böbreklere yeterince kan akışının sağlanamaması ve bunun sonucunda üre ve kreatinin kandan yeterli düzeyde uzaklaştırılmaması olduğu düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen ÜRE ve KREA düzeylerindeki artışlar sepsisli neonatal buzağlarda böbrek fonksiyonlarının negatif yönde etkilendiğini ortaya koymakta olup bu durum sepsis olgularında tanı, tedavi ve prognoz yönünden göz önünde bulundurulmalıdır.

T.BİL eritrositlerin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde yıkımlanması sonucu hem molekülünden üretilir. Plazmada indirekt bilirubin olarak bulunur ve albümine bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğerde konjuge olarak direk bilirubin halinde bağırsaklara taşınır (Kaneko, 1997, Klinkon ve Jezek, 2012). Serumda T.BİL artışı safra durgunluğu, karaciğer hastalıkları ve hemolitik anemilerde görülür. İndirekt bilirubin pre-hepatik olarak eritrosit yıkımlanması sonucu ve karaciğer kökenli olarak bilirubinin konjuge edilememesi sonucu artarken, direkt bilirubin ise karaciğer hastalıkları, safra durgunluğu ve safranın ince bağırsaklara akışının engellendiği durumlarda artmaktadır (Kaneko, 1997, Kaneko, 2008, Klinkon ve Jezek, 2012). Yeni doğanlarda fetal hemoglobinin yıkımlanmasına bağlı olarak T.BİL seviyesinin yükseldiği ve bunun 6-14 gün içinde normal seviyeye döndüğü rapor edilmiştir (Kurz ve Willet, 1991, Kaneko, 1997, Tennant, 1997, Mohri ve ark., 2007, Klinkon ve Jezek, 2012). İshalli buzağlarda yapılan birçok çalışmada serum T.BİL ve D.BİL seviyelerinde artış belirlenmiş olup bu artış karaciğer ve safra kanalı yıkımlanmalarına bağlanmıştır (Santos ve ark., 2002, Bozukluhan ve ark., 2017). Yapılan mevcut çalışmada ise sepsisli neonatal buzağların T.BİL ($p<0.01$) ve D.BİL ($p<0.001$) düzeylerinde önemli artışlar belirlenmiştir (Tablo 4). Sepsisli buzağlarda T.BİL'deki artışların her ne kadar fetal hemoglobinin yıkımlanmasından kaynaklanabileceği mümkünse de özellikle D.BİL'de de artışların olması ve bu artışların kontrol grubundan daha yüksek olması bunun kaynağının aynı zamanda

karaciğer veya safra durgunluğunun da olabileceği ihtimali ortaya çıkmaktadır.

Buzağlarda TP seviyesinin kolostrum alınması ile birlikte arttığı saptanmış olup Ig ile TP'nin buzağlarda ilk gün ölçülmesi buzağının yeterli düzeyde kolostrum alıp almadığının belirlenmesinde kullanılabilen ileri sürülmektedir (Tyler ve ark., 1998, Muri ve ark 2005, Jezek ve ark., 2006, Klinkon ve Jezek, 2012, Tothova ve ark., 2016). Buzağlarda Ig seviyelerinin ise kolostrum alınması ile birlikte ilk 2 gün artış gösterdiği daha sonra Ig'lerin bağırsaklarda yıkımlanması ile birlikte düşüşe geçtiği ve buzağının daha az düzeyde Ig sentezlemesi ile de bu düşüşün bir süre daha devam ettiği belirlenmiştir (Klinkon ve Jezek, 2012, Brar ve ark., 2014). İshalli neonatal buzağlarda yapılan çalışmalarda ise TP ve Ig düzeylerinin azalışı yetersiz kolostrum alınmasına, artışı ise dehidrasyona bağlanmıştır (Santos ve ark. 2002, Asati ve ark., 2008). Buzağlarda pasif immun transfer yetmezliğinin varlığı, Ig düzeyinin düşüklüğü, toksik nötrofil artışı ve kreatinin düzeyinin yüksekliği dominant sepsis bulgular olarak kabul edilirken, %HCT artışı, TP düşüşü ve PaCO₂ artışı veya PaO₂ düzeyindeki düşüşler gibi parametrelerin ise değişken sepsis parametreleri olduğu öne sürülmektedir (Lofstedt ve ark., 1999, Pardon ve Depres, 2018). Yapılan mevcut çalışmada ise sepsisli buzağların TP (p<0.01) ve Ig (p<0.001) değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüşler belirlenmiştir. (Tablo 4). Bu bulgulara ek olarak ayrıca sepsisli buzağlardan %50'sinin TP değerinin 2g/dl'nin altında ve %20'sinin ise Ig değerinin 20g/L'nin altında olduğu belirlenmiştir. Sepsis şüpheli buzağlarda dehidrasyona rağmen TP ve Ig değerlerinde düşüşlerin olması aynı zamanda bu buzağların yetersiz düzeyde kolostrum aldığını göstermektedir. Ayrıca sepsisin gelişmesi ve buzağların çoğunda enterit gibi enfeksiyon tablosunun da olması bu hayvanlarda pasif immun transfer yetmezliğinin olduğunu desteklemektedir.

Albumin karaciğerde sentezlenmekte olup serum konsantrasyonu karaciğerin gelişmişliği ve fonksiyon yeteneğine bağlıdır. Buzağlarda yapılan

bazı çalışmalarda ALB seviyesinin doğumdan sonra kısa süreli arttığı (Knowles ve ark., 2000, Jezek ve ark., 2006, Kaur ve ark., 2006, Klinkon ve Jezek, 2012) bazı çalışmalarda ise önce kısa süreli düştüğü ve sonra artış gösterdiği (Santos ve ark., 2002, Lassen, 2004, Bednarski ve ark., 2015, Tothova ve ark, 2016) rapor edilmiştir. Buzağlarda uzun süren ishallerde ise hipoalbumineminin sebebi karaciğerin zarar görmesi ve artmış protein kullanımına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (Knowles ve ark, 2000, Jezek, 2007). Bununla birlikte ishallerde yapılan bir çalışmada ise ALB seviyesi dehidrasyon nedeniyle yüksek olduğu belirtilmiştir (Brar ve ark., 2014). Yapılan mevcut bu çalışmada ise serum ALB düzeyi sepsis şüpheli buzağlarda kontrol grubu değerlerine göre önemli düzeyde düşük (p<0.001) bulunmuştur (Tablo 4). Bu düşüşün muhtemel nedeni sepsiste ortaya çıkan şiddetli yangı ve dehidrasyona bağlı kan perfüzyonunun düşmesi sonucu karaciğer fonksiyonlarının da negatif yönde etkilenmesi olabilir.

AST birçok dokuda bulunmakta olup yumuşak doku yıkımlanmalarının iyi bir indikatörü olarak kabul edilmektedir. Bu enzim yoğun olarak kalp, iskelet kası ve karaciğer hücrelerinde stoplazma ve mitokondrilerde bulunur. Bu hücrelerde yıkımlanma veya membran geçirgenliğinin bozulduğu durumlarda serumdaki AST aktivitesi yükselmektedir (Kaneko, 1997, Kaneko 2008, Klinkon ve Jezek, 2012). ALP ise karaciğer, bağırsak ve kemik hücrelerinde bulunur ve hızlı büyüyen genç hayvanlarda kemik kökenli olarak yükseldiği bildirilmiştir (Kaneko, 1997). Serum ALP aktivitesinin gastroentestinal yangı sonucu yıkımlanan bağırsak hücreleri, kolastasis, osteoblastik ve osteoklastik aktivite artışı, hepatoselüler sirkülasyonun bozulması, karaciğer yıkımlanması ve strese bağlı olarak arttığı ortaya konulmuştur (Kaneko, 1997, Klinkon ve Jezek, 2012). GGGT enzimi en yüksek olarak safra kanalı ve böbrek hücrelerinde bulunur. Serum GGT aktivitesinin yükselmesi safra durgunluğu ve safra kanalı yıkımlanmasına işaret eder (Kaneko, 1997, Kaneko, 2008, Klinkon ve Jezek, 2012). Ayrıca kolostrum alan buzağlarda hızla yükseldiği ve 20 gün içinde normal seviyeye indiği bildirilmektedir.

Yeni doğanlarda serum GGT aktivitesinin düşük olması yetersiz kolostrum alınmasına işaret olarak kabul edilebilir (Klinkon ve Jezek, 2012). LDH enzimi hemen hemen bütün dokularda bulunmakta olup yoğun olarak karaciğer, kalp, böbrek, kas ve eritrositlerde bulunur. Serum düzeyindeki artışlar genellikle kas nekrozu, karaciğer hasarı ve hemolizlerde ortaya çıkmaktadır (Kaneko, 1997). İshalli neonatal buzağlarda yapılan çalışmalarda serum LDH düzeyinin arttığı ve bunun karaciğer paransim yıkımlanmaları ve kalp hasalardan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Sobiech ve Kuleta, 2006). İshalli buzağlarda toksemiye bağlı karaciğer hasarı sonucu ALT AST ve GGT seviyelerinde artış olabileceği ifade edilmektedir (Sobiech ve Kuleta, 2006, Başer ve Civelek, 2013, Bozukluhan ve ark., 2017, Aydoğdu ve Güzelbektaş, 2018). Yapılan mevcut çalışmada sepsisli buzağlarda AST ($p<0.01$) ve LDH ($p<0.001$) değerlerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Sepsisli buzağlarda ALP düzeyi yüksek olmakla birlikte kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4). Sepsisli buzağların GGT seviyeleri ise kontrol grubu değerlerine benzer olduğu saptanmıştır. Serum AST, LDH, GGT, ALP düzeyleri kolostrum almış buzağlarda yüksek olduğu rapor edilmiş olmakla birlikte kontrol grubu buzağlarında kolostrum aldığı ve aynı yaş grubu olduğu düşünüldüğünde bu çalışmada elde edilen farkların kolostrumdan kaynaklanmadığı bunun aksine başka bir kaynaktan köken aldığı düşünülebilir (Kurz ve Willet, 1991, Tyler ve ark., 1998, Knowles ve ark., 2000, Muri ve ark 2005, Jezek, ve ark., 2006, Jezek 2007, Mahri ve ark., 2007, Klinkon ve Jezek, 2012, Pekcan ve ark., 2013, Brar ve ark., 2014, Tothova ve ark., 2016). Dolayısı ile yapılan bu çalışmada AST düzeyindeki artış daha önceki çalışmalarda vurgulandığı gibi sepsis sonucu gelişen karaciğer yangısından kaynaklanabileceği buna karşın ALP'deki artışın ise gastrointestinal yangıya bağlı bağırsak hücrelerindeki yıkımlanma, safra kanalı yangısı, koleoastasis, hepatoselüler kan sirkülasyonunun bozulması ve stres sonucu olabileceği düşünülmektedir (Kaneko, 1997, Sobiech ve Kuleta, 2006, Klinkon ve Jezek, 2012,

Başer ve Civelek, 2013, Bozukluhan ve ark., 2017, Aydoğdu ve Güzelbektaş, 2018). Sepsisli buzağlarda GGT düzeyinin yükseliş göstermemesi ise TP ve Ig bulgularının da desteklediği gibi yetersiz kolostrum alınması ile ilişkilendirilebilir (Klinkon ve Jezek, 2012). Yapılan bu çalışmada, yatan (şiddetli derecede) sepsisli buzağlarda daha çok sayıda hayvanda biyokimyasal parametrelerde değişim olduğu saptanmış olup bu bulgular ışığında sepsisin şiddeti ile bu parametrelerdeki değişim arasında bir paralelliğin olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular sepsisin neonatal buzağlarda klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde önemli değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Sepsisin yatan hayvanlarda (şiddetli derecede sepsis) daha şiddetli seyrettiği ve daha şiddetli karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluklarına neden olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bu parametrelerin sepsiste buzağlarda prognostik indikatör olarak öneminin ortaya konulabilmesi için daha çok sayıda hayvanda, daha sık örnekleme ile yapılacak kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0467-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Al-Khafaji, A.H., Pinsky, M.R., 2017. Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Sepsis, [http://emedicine.medscape.com/article/169640-overview.\(10.03.2016\)](http://emedicine.medscape.com/article/169640-overview.(10.03.2016)).

Angus, D.C., Van der Poll, T., 2013. Severe sepsis and septic shock. The New England Journal of Medicine, 369(9):840-851.

Asati, C.K., Roy, S. and Roy, M., 2008. Haemato-biochemical study and diagnosis in calves. Intas-Polivet, 2, 245-248.

Aydoğdu, U., Güzelbektaş, H., 2018. Effect of colostrum composition on passive calf immunity in primiparous and multiparous dairy cows. Veterinarni Medicina, 63,1-11

- Basoglu, A., Baspinar, N., Tenori, L., Hu, X., Yildiz, R., 2014.** NMR Based Metabolomics Evaluation in Neonatal Calves with Acute Diarrhea and Suspected Sepsis: A New Approach for Biomarker/S Metabolomics, 4, 1-6.
- Başer, D.F., Civelek, T., 2013.** Correlations between venous acid-base status and renal function in neonatal calves with acute diarrhea. *Kocatepe Veterinary Journal*, 6, 25-31
- Bedenice, D.C., 2016.** Overview of Management Of the neonate in Large Animals. Merck Veterinary Manual 11th edition, <http://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition>.(16.5.2017).
- Bednarski, M., Kupczynski, R., Sobiech, P., 2015.** Acid-base disorders in calves with chronic diarrhea. *Polish Journal of Veterinary Sciences.*, 18, 207–215.
- Bozukluhan, K., Merhan, O., Gökçe, H.İ., Deveci, H.A., Gökçe, G., Ongun, M., Maraşlı, Ş., 2017.** Alterations in lipid profile in neonatal calves affected by diorrhea. *Veterinary World*, 10, 786–789.
- Brar, A.P.S., Sood, N.K., Ahuja, C.S., Sandhu, B.S., Gupta, K., Singh, C.K., 2014.** Serum biochemical changes in neonatal diarrhoeic calves of different age groups. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 38, 14-17.
- Brar, T.K., Singh, K.D., Kumar, A., 2015.** Effect of different phases of menstrual cycle on heart rate variability (HRV). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 1-4.
- Cho Y-il, Yoon K-jin 2014.** An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Sciences*, 15 (1), 1–17.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H., Grünberg, W., 2016.** *Veterinary Medicine*, 11th ed, Saunders Ltd. China, p: 57-67.
- Egli, C.P., Blum, J.W., 1998.** Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation. *Zentralbl Veterinarmed A.*, 45, 99-118.
- Fecteau, G., Pare, J., Van Metre, D.C., Smith, B.P., Holmberg, C.A., Guterbock, W., Jang S., 1997.** Use of a clinical sepsis score for predicting bacteremia in neonatal dairy calves on a calf rearing farm. *Canadian Veterinary Journal*, 38, 101-104.
- Fecteau, G., Smith, B.P., George, L.W., 2009.** **Sepsicemia and meningitis in the newborn calves.** *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 25, 195-208.
- Gasparavic, V., Dakovic, K., Gornik, I., Radonic, R., 2014.** Severe Acute Pancreatitis as a Part of Multiple Dysfunction Syndrome. *Collegium Antropologicum*, 38, 125–128.
- Himanshu, 2010.** Clinico-pathologic and therapeutic studies on enteritis in neonatal calves. Department of Veterinary Medicine, CSK Himachal Pradeshli Krislii Vishvavidyalaya PaJampur-176 062 (H.P.) India.
- House, A.M., Irsik, M., Shearer, J.K., 2008.** Sepsis, Failure of Passive Transfer, and Fluid Therapy in Calves.1 *Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department publications*, <http://www.calfology.com>, p: 1-5.
- Jezeq, J., 2007.** The dynamics of serum immunoglobulin concentrations and hematological and biochemical parameters in the period to the age of 24 weeks in diferently reared calves, p: 172, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija.
- Jezeq, J., Klocic, M., Klinkon, M., 2006.** Influence of age on biochemical parameters in calves. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 211–214.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. p: 364-390.6th ed. Academic Press, New York. ABD.
- Kaneko, J.K., 1997.** *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed, Academic pres, San Diego, p: 413.
- Kaur, K., Randhawa, S.S., Chhabra, S., 2006.** Haemato-biochemical profile of diarrhoeic dairy calves affected with colibacillosis. *Indian Journal of Veterinary Medicine*, 26, 9-11.
- King, E.G., Bauza, G.J., Mella, J.R., Remick, D.G., 2014.** Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Laboartory Investigation*, 94, 4–12.
- Klinkon, M., Jezeq, J., 2012.** Volues of blood variables in calves. 302-320. <https://www.researchgate.net/publication/290488632> Values of blood variables in calves.
- Knowles, T.G., Edwards, J.E., Bazeley, K.J., Brown, S.N., Butterworth, A., Warriss, R.D., 2000.** Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Veterinary Record*, 147, 593-598.
- Kumar, S., Jakhar, K.K., Nehra, V., Singh, S., 2018.** Alterations of haemato-biochemical and oxidative stress parameter in diarrhoeic buffalo calves. *The Pharma Innovation Journal*, 7, 195-197.

- Kurz, M.M., Willett, L.B., 1991.** Carbonhydrate, enzyme, and hematology Dynamics in newborn calves. *Journal of Dairy Sciences.*, 74, 2109-2118.
- Lassen, E.D., 2004.** Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: Thrall MA, editor. *Veterinary hematology and clinicalchemistry.* Philadelphia (PA): Lippincott Williams &Wilkins, p: 401–415.
- Lofstedt, J., Dohoo, I.R., Duizer, G., 1999.** Model to predict septicemia in diarrheic calves. *Journal of Verterinary Internal Medicine*, 13, 81-8.
- Maach, L., Grunder, H.D., Boujya, A., 1992.** Clinical and haematological investigations in new born Holstein Friesian calves with diarrhea in Morocco. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, 99, 133-140.
- Maden, M., Birdane, F.M., Altunok, V., Dere, S., 2004.** Serum and colostrum/milk alkaline phosphatase activities in the determination of passive transfer status in healty lambs. *Revue de Medecine Veterinaire*, 155, 565-569.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss M., 2003.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine* 348, 1546-1554.
- McGuirk, S.M., 2011.** Management of Dairy Calves from Birth to Weaning. Ed (s): Risco, CA, Retemal PM, Dairy Production Medicine, Wiley –Blackwell, West Sussex, p: 175-182.
- Merx, M.W., Weber, M.D., 2007.** Sepsis and the Heart. *Circulation*, 116, 793-802.
- Mohri, M., Sharifi, K., Eidi, S., 2007.** Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Sciences*, 83, 30–39.
- Muri, C., Schottstadt ,T., Hammon, H.M., Meyer, E., Blum, J.W., 2005.** Hematological. Metabolic and endocrine effects of feedning vitamin A and lactoferin in neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 88, 1062-1077.
- Osterbur, K., Mann, F.A., Kuroki, K., DeClue, A., 2014.** Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 1141–1151.
- Pardon, B., Deprez, P., 2018.** Rational antimicrobial therapy for sepsis in cattle in face of the new lagislation on critically important antimicrobials. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 87, 37-46.
- Pekcan, M., Fidancı, U.R., Yüceer, B., Özbeyaz, C., 2013.** Estimation of passive immunity in newborn calves with routine. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 60, 85-88.
- Poulsen, K.P., Foley, A.L., Collins, M.T., McGuirk, S.M., 2010.** Comparison of passive transfer of immunity in neonatal dairy calves fed colostrum or bovine serum-based colostrum replacement and colostrum supplement products. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 237, 949–954.
- Rastawicki, W., Paradowska-Stankiewicz, I., Stefanoff, P., Zasada, A.A., 2011.** Reliability of the cut-off value in the routine serodiagnosis of pertussis performed by the commercial ELISA assays. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 63, 73-80.
- Santos, R.L., Renee, M., Baumler, J. and Adams, L., 2002.** Hematologicand serum biochemical changes in Salmonella ser Typhimurium-infectedcalves. *American Journal of Veterinary Research*, 63, 1145-115.
- Singh, M., Gupta, V.K., Mondal, D.B., Bansal, S.K., Sharma, D.K., Shakya, M., Gopinath, D., 2014.** A study on alteration in haemato-biochemical parameters in Colibacillosis affected calves. *International Journal of Advanced Research*, 2, 746-750.
- Smith, B.P., 2015.** Large Animal Internal Medicine, 5th edition, Elsevier Press, Missouri, p 221-339.
- Sobiech, P., Kuleta, Z., 2006.** Activity of LDH isoenzymes in diarrhoeic calves. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 401-404.
- Şen İ., Güzelbekteş H., Yıldız R., 2013.** Neonatal Calf Diarrhea: Pathophysiology, Epidemiology, Clinic, Treatment And Protection. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 4, 71-78.
- Thomas H.S., 2014.,** Septicemia and Toxemia in Calves, *Angus Beef Bulletin*, 7, 1.
- Tothova, C., Nagy, O., Kovac, G., Nagyova, V., 2016.** Changes in the concentratios of serum proteins in calves during the first month of life. *Journal of Applied Animal Research*, 44, 338-346.
- Tyler, J.W., Hancock, D.D, Wiksie, S.E., Holler, S.L., Gay, J.M., Gay, CC., 1998.** Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12, 79-83.
- Vincent, J.L., Sakr, Y., Sprung, C.L., 2006.** Sepsis in Europeanintensivecareunits: results of the SOAP study. *Critical Care Medicine*, 34, 344–353.
- Yıldız R., Beslek M., Beydilli Y., Özçelik M., Biçici Ö., 2018.** Evaluation of Platelet Activating Factor İn Neonatal Calves With Sepsis. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 89, 66-73.

The Effect of *Lysimachia sarranii* on the Breast Cancer Cells in Cell Culture Conditions Compared to Normal Cells

Lysimachia Sarranii'nin Hücre Kültürü Ortamında Normal Hücrelere Göre Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi

Işıl AYDEMİR^{1*}, Caner ÖZBEY², Gonca DÖNMEZ ARAT³, Oktay ÖZKAN⁴, Ahmet SAVRAN⁵, Sevinç İNAN⁶, Mehmet İbrahim TUĞLU⁷

¹Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Nigde, Turkey

²Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Nigde, Turkey

³Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Medicinal Biology, Nigde, Turkey

⁴Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Medicinal Pharmacology Nigde, Turkey

⁵Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Nigde, Turkey

⁶Izmir University of Economics, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Izmir, Turkey

⁷Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Manisa, Turkey

Abstract: The breast cancer has become a threat to women's lives at an increasing rate. The inadequate treatments of surgical procedures and chemotherapy affect negatively the quality of patient life. Therefore, there has been an increase in demand for alternative and supportive agents, especially for the use of herbal products. The purpose of this study is to evaluate the *in vitro* anti-tumor activity of *Lysimachia sarranii* in breast cancer cell lines compared to normal adipose tissue derived mesenchymal stem cells. The adipose tissue derived mesenchymal stem cells as normal cells with MCF-7 and, MDA-MB-231 breast cancer cells were cultured. IC₅₀ doses of *Lysimachia sarranii* extract for each cells were determined via 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The immunocytochemical staining was performed for the oxidative stress by eNOS, whereas apoptosis were analyzed by TUNEL method. The data exhibited with H-score and apoptotic index. The plant extract inhibited the proliferation and survival in the breast cancer cells compared to the stem cells. *Lysimachia sarranii* extract caused the increase of eNOS staining for oxidative stress and the TUNEL labeling for apoptosis. The further molecular techniques should be used to determine the biologic activity of *Lysimachia sarranii* extract and its content should be investigated.

Keywords: *Lysimachia sarranii*, breast cancer, proliferation, cytotoxicity.

Öz: Meme kanseri, giderek artan oranda kadınların yaşamları için bir tehdit haline gelmiştir. Yetersiz cerrahi işlemler ve kemoterapi tedavileri hasta yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, özellikle bitkisel ürünlerin kullanımı için alternatif ve destekleyici ajanlara olan talep artmıştır. Bu çalışmanın amacı, meme kanseri hücre dizinlerinde *Lysimachia sarranii*'nin *in vitro* anti-tümör aktivitesini, normal yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle karşılaştırarak araştırmaktır. Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, *in vitro* ortamda kültüre edildi. Her bir hücre için *Lysimachia sarranii*'nin IC₅₀ dozları MTT metodu ile belirlendi. Oksidatif stres için eNOS ile immünohistokimyasal boyama yapılırken, apoptosis TUNEL metodu ile analiz edildi. Veriler H-skor ve apoptotik indeks ile gösterildi. Bitki ekstraktının, meme kanseri hücrelerinde, proliferasyon ve canlılığı, kök hücrelere kıyasla inhibe ettiği görüldü. *Lysimachia sarranii* ekstraktı, oksidatif stres için eNOS ve apoptoz için TUNEL boyanmasında artışa neden oldu. *Lysimachia sarranii* ekstraktının biyolojik aktivitesini belirlemek için başka moleküler teknikler kullanılmalı ve içeriği araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Lysimachia sarranii*, meme kanseri, proliferasyon, sitotoksosite.

*Corresponding author : Işıl AYDEMİR

e-mail : isil_aydemir@yahoo.com

Geliş tarihi / Received : 08.10.2019

Kabul tarihi / Accepted: 12.11.2019

Introduction

In the health area, the cancer is the second most common cause of death after cardiovascular disease. Especially in women, breast cancer is a

major health problem because of its high mortality and morbidity. Therefore, intensive research is needed to treat this type of cancer (Torre et al.,

2016, DeSantis et al., 2016). With the increase in breast cancer cases in recent years, the status of metastasis negatively affects the treatment. It is reported that the risk of metastasis is higher in breast cancer, especially estrogen receptor independent. Because of metastasis, cancer treatment may be inadequate, and therefore there is a tendency to seek alternative or complementary treatment options. The herbal products are one of alternative or complementary treatment agents. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that many chemotherapeutic agents and herbal products are used for their cytotoxic effect and antitumorigenic properties on breast cancer (Hack et al., 2015, Kim et al., 2015, Zheng et al., 2016, Tariq et al., 2017).

The reactive oxygen species (ROS) play a role in the metabolic events of the cells, but the accumulation of ROS causes cell death by oxidative stress (Trachootham et al., 2009). In the cancer treatment, the aim is to trigger cell death of tumor cells without damaging healthy cells. The apoptosis is desired because it is programmed cell death (Sumalatha et al., 2017).

Lysimachia savranii is a new species belonging to the Primulaceae family and the biological effects of this specie have not been studied. The other species of Primulaceae, such as *Lysimachia capillipes*, *Lysimachia punctata*, *Lysimachia fortunei*, *Lysimachia parvifolia*, *Lysimachia nummularia* and *Lysimachia clethroides* have been reported to have analgesic, antibacterial, antiinflammatory and cytotoxic effects (Podolak et al., 2005, Podolak et al., 2013, He et al., 2013, Liang et al., 2013, Fei et al., 2014). In the current experiment, we aimed to define the cytotoxic effect of *Lysimachia savranii* extract on adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADSCs), MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines by oxidative stress and cell death.

Material and Methods

Preparation of Plant Extract

Lysimachia savranii was gathered in term of July 2013 from the Bolkar Mountains within the boundaries of Niğde province. Its taxonomic classification was made by biologist Ahmet Savran.

In the current study, the leaf parts of the plant were used for extraction. The extraction method was performed according to the previously described protocol (Atila et al., 2019). Briefly, the dried plant materials were powdered using electric blender. Twenty gram (20.0 g) of *Lysimachia savranii* powdered samples were extracted with 500 ml of solvents (95% ethanol) for 3 h by using Soxhlet apparatus. The extract were concentrated using a rotary evaporator at 40 °C.

Cell Culture

The breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were purchased from DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany. As control group, adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADSC), in a previous study (Ethics approval number: 17/09/2014/77.637.435-32, Manisa Celal Bayar University, Animal Experiments Local Ethics Committee) frozen, were used. MCF-7 and MDA-MB-231 were grown in RPMI-1640 (F1213, Biochrom, Berlin Germany) containing 10% fetal bovine serum (S0113, Biochrom, Berlin Germany), 200mM L-glutamin, 100UI/ml penicillin/streptomycin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), at 37°C in 5 % CO₂ in a humidified atmosphere. ADSCs at passage 3 were taken from -80°C and were dissolved at 37°C. Then the cells were cultured in alpha-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany), 10% fetal bovine serum µg/ml gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100UI/ml penicillin/streptomycin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml amphotericin B (A2612, Biochrom, Berlin, Germany) and 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany). The medium was changed every two days.

Cytotoxicity Assay

To detect IC₅₀ of *Lysimachia savranii* extract for each cells, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, M5655, Sigma, Steinheim, Germany) assay was performed. All cells were put into 96-well (2.5x10⁵ cells/well) plates and seeded for 24 h. The cells were treated with an increasing concentration of plant extract

in ethanol (0, 0.1, 1, 10, 30, 100 µg/ml) for 24 hours. Then the media containing extract was removed and 100 µL of fresh medium and 10 µL MTT (5 mg/ml in distilled water) were added. After the incubation with MTT at 37°C for 4 h, media containing MTT was discharged, and 100 µL of dimethyl sulphoxide (DMSO, A3672, AppliChem, Darmstadt, Germany) was put into each well. The absorbance was measured at a wavelength of 570 nm using an UV visible spectrophotometer multiplate reader (ELx800UV, BioTek). The IC₅₀ dose of plant extract was calculated for each cell (Deliloglu-Gurhan et al., 2006).

Immunocytochemistry

The immunocytochemistry staining was performed to detect the level of oxidative stress marker endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Following the treatment with IC₅₀ dose of plant extract for 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (1.04004, Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen) at +4°C for 30 min and were washed in PBS for 5 min. The cells were treated with 0.1% Triton X-100 (A4975, AppliChem, Darmstadt, Germany) at +4°C for 15 min for permeabilization and the endogenous peroxidase activity was inhibited by 3% hydrogen peroxide (1 08600, Merck, Darmstadt, Germany). Then primary antibody anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology) was applied to the each cell at +4°C overnight. For negative control, some samples were not put the primary antibody. Then the biotinylated secondary antibodies and peroxidase-conjugated streptavidin (Histostain kit, 85-9043, Zymed, Carlsbad, USA) were used. The diaminobenzidine/hydrogen peroxide (DAB, 00-2014, Invitrogen, CA, USA) and counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (800-729-8350, ScyTek, UT, USA). The cell samples were mounted using aqueous media (K002, DBS, Pleasanton, USA) (Özdemir et al., 2016). Under light microscope (BX53, Olympus, Japan) camera attached (SC50, Olympus, Germany), the images of stained cells were obtained. The immunocytochemistry assay was performed triplicate. The staining was evaluated as weak (+),

moderate (++) and strong (+++) respectively, in five different microscopic areas. The cells were counted for each intensity and the respective score was calculated by the following formula H-Score = Pi (intensity of staining + 1). Pi is the percentage of stained cells for each intensity, varying from 0% to 100%. The H-score was evaluated by at least two observers blinded to study independently (Ozbilgin et al., 2015).

TUNEL assay

After the plant extract application, apoptotic cells were detected by terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL Promega G7130) method was used to detect the apoptotic cells. For fixation, 4% paraformaldehyde was used and for permeabilization, the cells were treated with 0.1% Triton X-100 for 15 min. After washing in PBS, endogenous peroxidase activity was eradicated by 3% hydrogen peroxide. After equilibration buffer process, cells were incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (Tdt-enzyme) for 1 h at 37°C. Then cells were applied with 2× SCC solution for 15 min. The apoptotic cells were made visible by DAB staining and cells were stained with Mayer's haematoxylin for counterstaining. Cells were mounted with aqueous media. The TUNEL staining procedure was repeated three times (Tuğlu et al., 2010). The apoptotic cells were counted using light microscope (BX53, Olympus, Japan) by two blinded observer. The TUNEL positive and negative cells were counted in 10 randomly chosen areas, and the apoptotic index was revealed as: Apoptotic index = (number of apoptotic cells / total number of cells) × 100 (Pourheydar et al., 2016).

Statistical analysis

The results were statistically analyzed in GraphPad Software (San Diego, CA, USA) using repeated-measures of the ANOVA test and the data was given as mean ± SD values. The differences between groups was determined by The Tukey-Kramer multiple comparisons test and values for P<0.05 were defined as significant (Metel et al., 2016).

Results

In our study, the IC₅₀ doses of *Lysimachia savranii* extract determined to be 16.25 µgr/ml for ADSC,

13.75 µgr/ml for MCF-7, and 12.5 µgr/ml for MDA-MB-231 by MTT assay. The plant extract was found to be significantly more toxic for MDA-MB-231 cells (Figure 1).

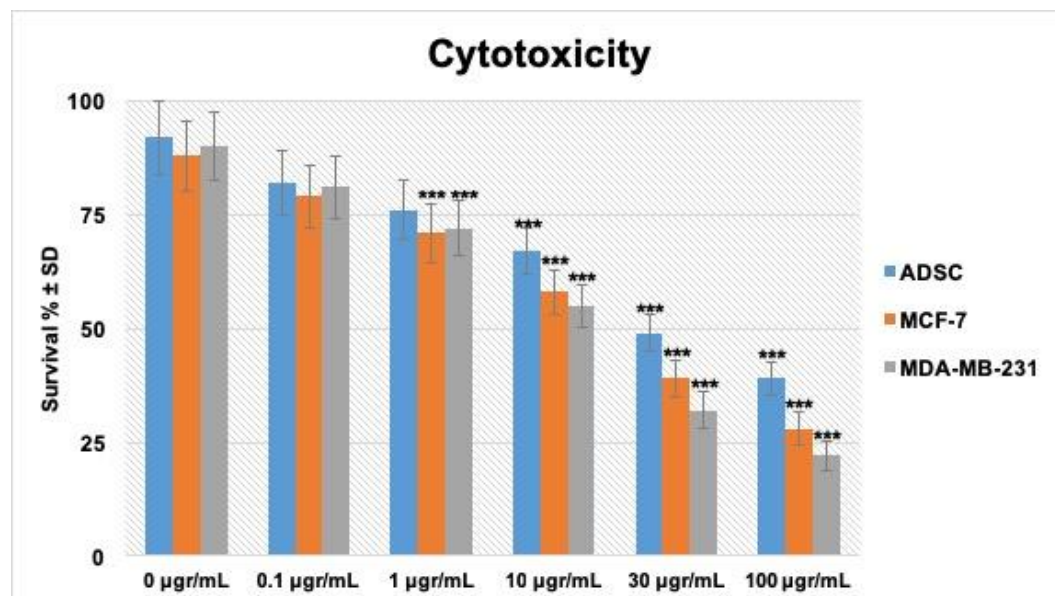


Figure 1. The cytotoxicity level of *Lysimachia savranii* extract on ADSCs, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines for 24 h (**P<0.001).

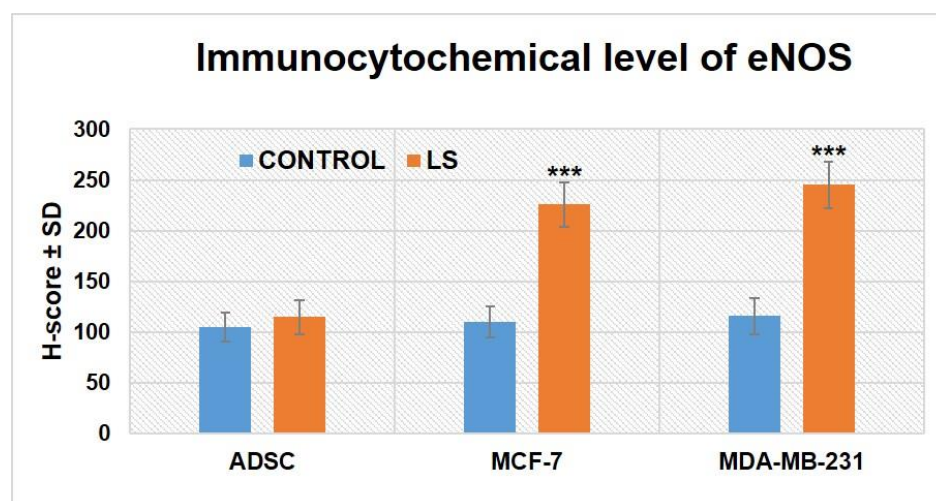


Figure 2. H-score analysis of immunocytochemical staining of eNOS in ADSCs, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells after application of *Lysimachia savranii* extract (IC₅₀ dose) for 24 h (**P<0.001).

By immunocytochemistry staining, oxidative stress marker, eNOS was evaluated after IC₅₀ doses of plant extract application by H-score (Figure 2).

There was not a significant difference between plant extract treated ADSCs and non-treated

ADSCs (P<0.05). The immunoreactivity of eNOS was higher in MDA-MB-231 and MCF-7 cells than treated with plant extract ADSCs (**P<0.001). However, immunoreactivity was found to be increased in MDA-MB-231 cells (**P<0.001) than MCF-7 cells (Figure 3).

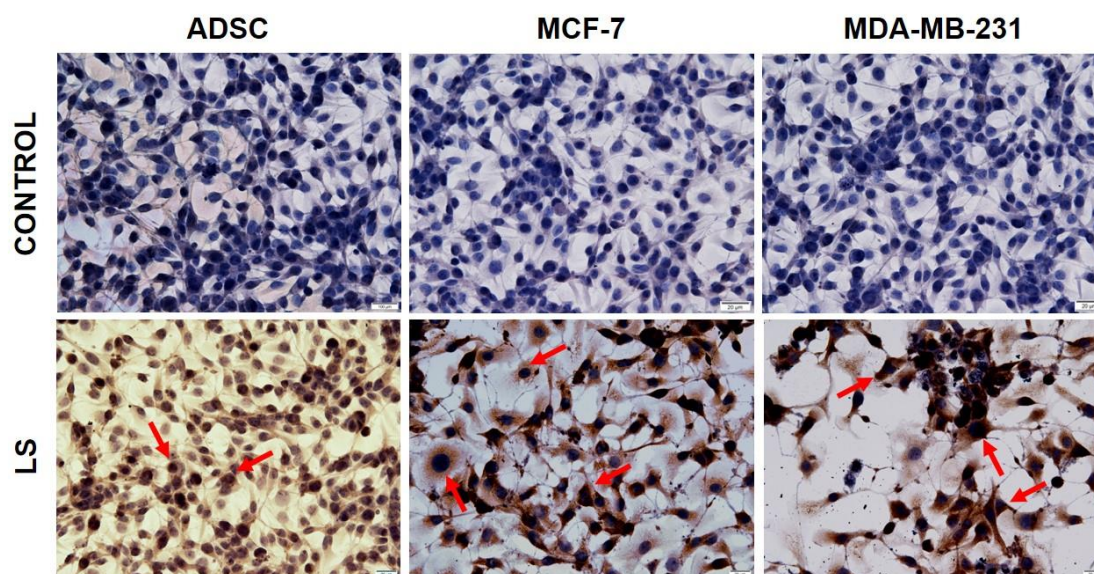


Figure 3. The distribution of immunocytochemical staining of eNOS in ADSCs, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells after application of *Lysimachia savranii* extract (IC₅₀ dose) for 24 h. Arrows: Immunopositive cells, Scale bars: 20µm.

Table 1. The apoptotic index in ADSCs, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells after application of *Lysimachia savranii* extract (IC₅₀ dose) for 24 h.

CELL	CONTROL	LS
ADSC	9,8±1,1	10,0±1,2
MCF-7	10,6±1,2	12,0±1,5
MDA-MB-231	10,1±1,3	13,2±1,7

The apoptotic index were given in Table 1. In ADSCs, the increase of apoptotic cell number was not statistically significant with the application of plant extract (P<0.05). However, a significant increase in MDA-MB-231 cells was noted compared to non-treated cells (**P<0.01) (Figure 5). Similarly, in treated MCF-7 cells, there was an increase in apoptotic cells compared to non-treated cells (**P<0.01). The number of apoptotic cells was the highest in the treated MDA-MB-231 cells.

Discussion

The current study has showed that *Lysimachia savranii* extract has a cytotoxic effect on breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. The antiproliferative effect was revealed by the MTT, immunocytochemical and TUNEL assays. The distribution of eNOS was enhanced by the application of *Lysimachia savranii* extract, and also apoptotic cell count was also increased. The specie we used in our study, *Lysimachia savranii*, have not been investigated in the previous studies, whereas the other species of *Lysimachia* genus were studied *in vivo* and *in vitro* experiments.

Capilliposide C agent in the saponins group isolated from *Lysimachia capillipes* showed no cytotoxic effect below 1µg / ml in the TE-1 and TE-2 esophageal squamous carcinoma cells. After 48 hours of administration, the IC₅₀ dose for TE-1 cells was reported to be 5.43 ± 0.63 µM and 6.64 ± 0.91 µM for TE-2 cells. When capilliposide C combined with oxaliplatin, it has been observed that antiproliferative effect is increased by synergistic effect and thus apoptosis is triggered. This effect is shown by PI3K/Akt/mTOR pathway which plays an important role in proliferation and metastasis, and also the increase

of Cas3 and Bax from apoptotic markers are supported the antiproliferative effect (Shen et al., 2017).

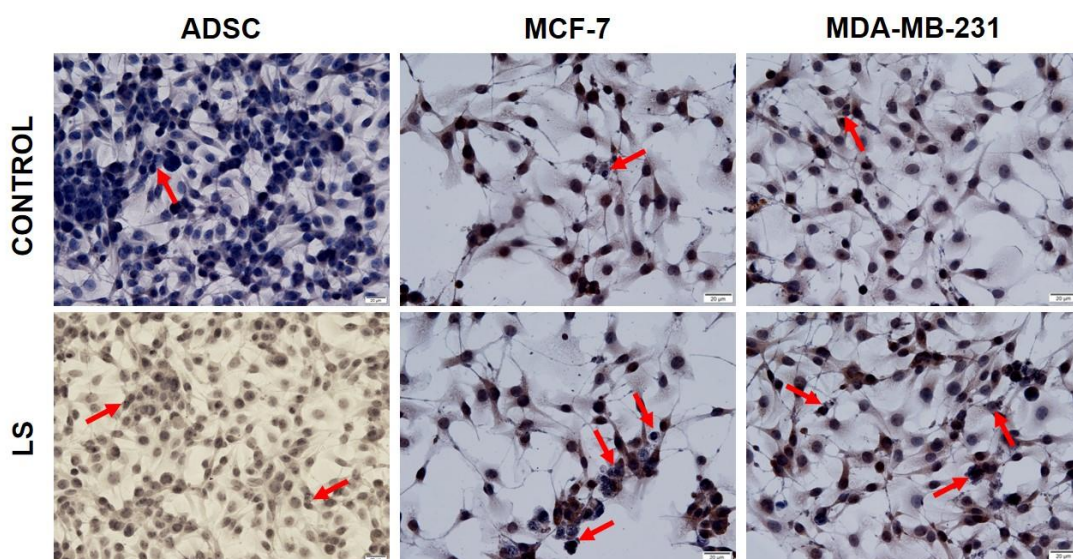


Figure 5. TUNEL staining for apoptosis in ADSCs, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells after application of *Lysimachia savranii* extract (IC₅₀ dose) for 24 h. Arrows: Apoptotic cells, Scale bars: 20µm.

Another study with Capilliposide from *Lysimachia capillipes* examined its antitumorigenic effect on the lung cancer cell lines and experimental lung cancer model. It has cytotoxic effect against the lung cell lines A549, H1299 and H460 cells, and after 24 hours of treatment, the IC₅₀ dose was calculated as 4.13µg / mL for A549 cells, 3.76 µg / mL for H1299 cells and 2.85 µg / mL for H460 cells (Fei et al., 2014). In the study with PC3 and DU145 prostate cancer cell lines, IC₅₀ dose of Capilliposide C was found to be 5.53 ± 0.05 µMol / L for PC3 cells and 9.99 ± 1.98 µMol / L for MT3 cells. Annexin V-FITC / PI staining showed that apoptosis was enhanced with the increasing dose of Capilliposide C in PC3 cells, and this apoptotic effect was supported by the increase in Cyt-C and Bax and decrease in proCas3 with Western blot analysis (Li et al., 2014). In our study, we used the extract of *Lysimachia savranii*, not a compound. Whether the toxic effect of this extract is due to the whole or a compound it contains should be investigated. Similar to the content of our study, in a previous experiment, the cytotoxic effect of *Lysimachia nummularia* extract on PC3, DU145 prostate cancer cells and PNT2 normal

prostate cell, A-375 and BLM malignant melanoma and HSF skin fibroblast cells and U373 glioblastoma cells was reported. The IC₅₀ dose of *Lysimachia nummularia* extract determined as 7.4 ± 1.1 µgr/mL for PC3, 1.2 ± 0.3 µgr/mL for DU145, and 30.0 ± 3.2 µgr/mL for PNT2. While the extract showed toxic effect in prostate cancer cells at low doses, it was found that the dose increased for toxic effect in normal prostate cells. The IC₅₀ dose for A-375 was 23.2 ± 1.2 µgr/mL, BLM was 17.5 ± 1.6 µgr/mL, for HSF was 21.3 ± 1.8 µgr/mL, and for U373 glioblastoma cells was 6.0 ± 1.3 µgr/mL. Furthermore *Lysimachia nummularia* extract in prostate and glioblastoma cells was found to be toxic at lower doses compared to skin cancer cells (Podolak et al., 2013). In the current study, the IC₅₀ dose of *Lysimachia savranii* extract was detected as 16.25 µgr/ml for ADSCs, 13.75 µgr/ml for MCF-7, and 12.5 µgr/ml for MDA-MB-231. Besides, cytotoxic effect was supported with the increase of apoptosis and oxidative stress.

In our study, we used only the leaves of *Lysimachia savranii*. In previous studies, the aerial parts of

Lysimachia genus plants were used, such as *Lysimachia foenum-graecum* and *Lysimachia fortunei*. The several compounds were isolated from aerial parts of these species, and their cytotoxic effects against to the varied cancer cell lines were reported (Dai et al., 2017, Zhang et al., 2018). Our aim is to emphasize that different parts of the plant may contain different compounds and therefore their effect on cancer cells may change.

Conclusion

In our experiment, *Lysimachia savranii* extract was found to have toxic effect on breast cancer cells. The toxic effect was demonstrated by MTT, immunocytochemical staining and apoptosis. These findings should be supported by molecular techniques and further studies of *in vitro* and *in vivo* models.

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

References

Atila, G., Bilgili, A., Uslu, H., Erdağ, D., Özkan, O., 2019. Effects of *Allium tuncelianum* on hyperglycemia and oxidative stress in the kidney and liver tissues in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 66, 185-190.

Dai, L.M., Huang, R.Z., Zhang, B., Hua, J., Wang, H.S., Liang, D., 2017. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Lysimachia foenum-graecum*. Phytochemistry 136, 165-174. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.01.021.

Deliloglu-Gurhan, I., Tuğlu, I., Vatansever, H.S., Ozdal-Kurt, F., Ekren, H., Taylan, M., Sen, B.H., 2006. The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. Saudi Medical Journal 27(3), 305-11.

DeSantis, C.E., Fedewa, S.A., Goding Sauer, A., Kramer, J.L., Smith, R.A., Jemal, A., 2016. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. CA: A Cancer Journal for Clinicians 66(1), 31-42. doi: 10.3322/caac.21320.

Fei, Z.H., Wu, K., Chen, Y.L., Wang, B., Zhang, S.R., Ma, S.L., 2014. Capilliposide Isolated from *Lysimachia capillipes* Hemsl. Induces ROS Generation, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 497456. doi: 10.1155/2014/497456.

Hack, C.C., Voiß, P., Lange, S., Paul, A.E., Conrad, S., Dobos, G.J., Beckmann, M.W., Kümmel, S., 2015. Local and Systemic Therapies for Breast Cancer Patients: Reducing Short-term Symptoms with the Methods of Integrative Medicine. Geburtshilfe Frauenheilkd 75(7), 675-682.

He, Z., Liang, F., Lu, J., Pan, Y., 2013. Cytotoxic triterpenoids from *Lysimachia parvifolia*. European Journal of Medicinal Chemistry 67, 390-7. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.06.043.

Kim, W., Lee, W.B., Lee, J.W., Min, B.I., Baek, S.K., Lee, H.S., Cho, S.H., 2015. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review. Complementary Therapies in Medicine 23(4), 626-32. doi: 10.1016/j.ctim.2015.03.011.

Mete, M., Aydemir, I., Ünsal, Ü.Ü., Duransoy, Y.K., Tuğlu, M.İ., Selçuki, M., 2016. Neuroprotective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in mechanically injured neuroblastoma cells. Turkish Journal of Medical Sciences 46, 1900-1907.

Özdal-Kurt, F., Tuğlu, I., Vatansever, H.S., Tong, S., Şen, B.H., Deliloğlu-Gürhan, S.I., 2016. The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. Biotechnic and Histochemistry 91(6), 412-22. doi: 10.1080/10520295.2016.1183819.

Ozbilgin, K., Karaca, F., Turan, A., Köse, C., Vatansever, S., Ozcakir, T., 2015. The higher heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in missed abortion. Taiwanese Journal of

Obstetrics and Gynecology 54(1), 13-8. doi: 10.1016/j.tjog.2013.08.011.

Li, R., Zhang, L., Zhang, L., Chen, D., Tian, J., Cao, L., Zhang, L., 2014. Capilliposide C derived from *Lysimachia capillipes* Hemsl inhibits growth of human prostate cancer PC3 cells by targeting caspase and MAPK pathways. *International Urology and Nephrology* 46(7), 1335-44. doi: 10.1007/s11255-013-0641-6.

Liang, D., Hao, Z.Y., Liu, Y.F., Luo, H., Wang, Y., Zhang, C.L., Zhang, Q.J., Chen, R.Y., Yu, D.Q., 2013. Bioactive carboxylic acids from *Lysimachia clethroides*. *Journal of Asian Natural Products Research* 15(1), 59-66. doi: 10.1080/10286020.2012.745855.

Podolak, I., Koczurkiewicz, P., Michalik, M., Galanty, A., Zajdel, P., Janeczko, Z., 2013. A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia* L. *Carbohydrate Research* 375, 16-20. doi: 10.1016/j.carres.2013.04.005.

Podolak, I., Galanty, A., Janeczko, Z., 2005. Cytotoxic activity of embelin from *Lysimachia punctata*. *Fitoterapia* 76(3-4), 333-5.

Pourheydar, B., Soleimani Asl, S., Azimzadeh, M., Rezaei Moghadam, A., Marzban, A., Mehdizadeh, M., 2016. Neuroprotective Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Bilateral Common Carotid Arteries Occlusion Model of Cerebral Ischemia in Rat. *Behavioural Neurology* 2016, 2964712.

Shen, Z., Xu, L., Li, J., Zhang, N., 2017. Capilliposide C Sensitizes Esophageal Squamous Carcinoma Cells to Oxaliplatin by Inducing Apoptosis Through the PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Medical Science Monitor* 23, 2096-2103.

Sumalatha, K., Gowda, M., 2017. Meenakshisundaram S. ROS-mediated induction of apoptosis by benzoquinone embelin in human

colon adenocarcinoma cells HT-29. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 14(2), pii:/j/jcim.2017.14.issue-2/jcim-2016-0131/jcim-2016-0131.xml. doi:10.1515/jcim-2016-0131.

Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O.O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B.B., Kumar, B., Islam, R., Adnan, M., 2017. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytotherapy Research* 31(2), 202-264. doi: 10.1002/ptr.5751.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., Jemal, A., 2016. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 25(1), 16-27. doi: 10.1158/1055-9965.

Tuğlu, İ., Özdal-Kurt, F., Koca, H., Sarac, A., Barut, T., Kazanç, A., 2010. The contribution of differentiated bone marrow stromal stem cellloaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 16 (5), 783-792. DOI:10.9775/kvfd.2010.1582.

Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P., 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Natural Reviews Drug Discovery* 8(7), 579-91. doi: 10.1038/nrd2803.

Zhang, S.L., Yang, Z.N., He, C., Liao, H.B., Wang, H.S., Chen, Z.F., Liang, D., 2018. Oleanane-type triterpenoid saponins from *Lysimachia fortunei* Maxim. *Phytochemistry* 147, 140-146. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.12.022.

Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Li, H.B., 2016. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. *Nutrients* 8(8), pii: E495. doi: 10.3390/nu8080495.

The Development of a Risk Evaluation Scale for Elderly Patients with Home Healthcare

Yaşlı Evde Bakım Hastaları Risk Değerlendirme Ölçeği Geliştirme Çalışması

Deniz SAY ŞAHİN^{1*}, Melek ZUBAROĞLU YANARDAĞ², Umut YANARDAĞ³

^{1*} Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Economics and Administrative Sciences, Department of Social Work, Burdur, Turkey.

² Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Economics and Administrative Sciences, Department of Social Work, Burdur, Turkey.

³ Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Department of Social Work, Faculty of Economics and Administrative Sciences, Burdur, Turkey.

Abstract: Home healthcare is a service model for which there is a currently growing need, especially for elderly patients. The examination of the home healthcare requirement risks under certain headings is of great importance for institutions or units providing home healthcare and for individuals applying for these services. To fill this gap, a 2-grade (yes/no) scale has been developed comprising 21 items to measure the home healthcare requirement risks of elderly patients in Turkey. In the context of the development of the scale, following a pilot study, a trial form of the scale was applied to 506 elderly individuals in the province of Burdur. Explanatory and confirmatory factor analysis was applied to the data, using R program, SPSS v. 24 (IBM Statistical Package for Social Sciences) and Lisrel 8.7 software. The scale that emerged at the end of the analysis comprised two dimensions; “The General Health Status and Physical Autonomy of the Patient” and “The Suitability of the Living Area of the Patient and the Economic Status”. The Kaiser-Meyer-Olkin value calculated for the scale was 0.603. the KR-20 internal consistency coefficient calculated was 0.895 for the first dimension, 0.680 for the second dimension and 0.840 for the whole scale.

Keywords: Aged, Homecare, Risk, Scale.

Öz: Evde bakım, günümüzde özellikle yaşlı hastaların sıklıkla ihtiyaç duyduğu bir hizmet modelidir. Evde bakım ve evde sağlık hizmeti veren kurum ve üniteler açısından bu hizmete başvuran bireylerin evde bakım ihtiyacı risklerinin belirli boyutlar altında incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu boşluğun doldurulması amacıyla Türkiye’deki yaşlı hastaların evde bakım ihtiyacı riskini ölçmeye yönelik 21 maddeden oluşan 2 dereceli (evet/hayır) bir ölçek geliştirilmiştir. Ölçek geliştirme çalışması kapsamında pilot uygulamanın ardından, Burdur ilinden 506 yaşlı bireye ulaşılarak ölçeğin deneme formu uygulanmıştır. Veriler açımlayıcı ve doğrulayıcı faktör analizine tabi tutulmuştur. Veriler R programı, IBM Sosyal Bilimler için İstatistik Paket Programı (IBM Statistical Package for Social Sciences-SPSS 24) ve Lisrel 8.7 kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonrasında ortaya çıkan ölçeğin, “Hastanın Genel Sağlık ve Fiziksel Özerklik Durumu” ve “Hastanın Yaşam Alanının Uygunluğu ve Ekonomik Durumu” olmak üzere iki boyuttan oluştuğu tespit edilmiştir. Ölçek için hesaplanan KMO değeri 0,603 olarak bulunmuştur. Ölçeğin birinci boyutu için hesaplanan KR-20 iç tutarlılık katsayısı 0,895; ikinci boyut için 0,680 ve tüm ölçek için ise 0,840 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yaşlı, Evde bakım, Risk, Ölçek.

*Corresponding author : Deniz SAY ŞAHİN
Geliş tarihi / Received : 22.10.2019

e-mail : saysahind@mehmetakif.edu.tr
Kabul tarihi / Accepted: 13.11.2019

Introduction

In Turkey as in many countries throughout the world, home care and home healthcare services

have become an important part of healthcare policies. In the framework of the existing healthcare policies in each country, home healthcare services are provided with different

models and there is a corresponding demand with increasing numbers of patients receiving home healthcare services.

Although different policies are applied throughout the world, home healthcare services are presented as “evaluation, observation and re-evaluation, the protection and development of health, the prevention of secondary disease or disability, the provision of personal care, medical care and nursing care, housework services, making the necessary adjustments to the home environment to meet the needs of disabled individuals, home rehabilitation service, to meet basic and special needs, the provision of supportive devices, equipment and drugs needs” (Işık *et al.*, 2016) and similar services. In the context of home healthcare services, patients benefit from various care and healthcare services in their home environment provided by those giving both formal and informal care. For these services to be able to be given effectively, the risks must be managed of the conditions in which the patient is located. Risk factors in home healthcare services vary according to the aim of the institution providing the care, the organisational structure, the personnel and the type of medical and nursing services provided (Brent 1994).

Home healthcare service risks were defined by Brueckner and Pace (1989) as an environment that cannot be controlled, services generally established on remote supervision and service outcomes varying according to the patient’s and the carer’s capabilities. According to another source, home healthcare service risks can be categorized as physical, chemical, ergonomic, biological and psychological (PQSA, 2013).

In a study by Markkanen *et al.* (2007), home healthcare service risks were defined as “an overheated room, poor air quality, an unhealthy environment with the presence of insects and rodents, unreliable neighbours, unstable patient or family members, potentially dangerous domestic animals and infection risks”. To be able to manage the various defined risks, potential incidents which may occur in the home must be evaluated, the

severity of potential incidents must be calculated and estimated, then based on these two factors, the priorities of controlling the risks must be investigated and steps taken to provide this (PQSA, 2013).

Home healthcare services in Turkey are in the form of examinations, tests, diagnosis, treatment, medical care, follow-up and rehabilitation for those who have difficulty accessing healthcare services because of advanced age and/or disease which is severely affecting social functionality and quality of life and including social and psychological counselling services in the family environment. As can be understood from the definition, home healthcare patients in Turkey can be evaluated in two groups. These are patients with a disease that is severely impairing quality of life and those who have difficulty accessing healthcare services because of age, irrespective of disease that impairs quality of life. There is a need for a risk evaluation tool related to the management of specific risks of how home healthcare services will be provided to these groups and for both social workers and healthcare personnel to be able to manage these risks.

According to the Turkish Statistics Institution, 52.3% of individuals with visual impairments, 48.7% of those with hearing problems, 71.4% of those who cannot walk unassisted and 84.7% of those who cannot go up and down stairs are aged >65 years. In addition, the elderly constitute the largest group within those who have received bedside treatment within the last year (TURKSTAT, 2016). In a study conducted in 2011 in the province of Burdur of elderly patients receiving home healthcare services, it was determined that 48.1% had disease involving hypertension, 39% had a full or partial stroke and 24% had heart disease, 37% required assistance with eating, 42.6% with going to bed and getting up, 65.7% with getting dressed and undressed, 36.1% with going to the toilet and 64.8% with washing and bathing. In addition, 97.2% reported that they were not able to perform daily housework, 95.4% could not go shopping, 99.1% were not able to undertake tasks outside the home

(paying bills, hospital visits) and 93.5% could not travel outside their own city (Çatak *et al.*, 2012).

To summarise, the elderly have a high rate of discomfort or disability that affects quality of life in comparison with other age groups. There is no comprehensive scale made with reliability and validity studies that measures the home healthcare requirement risk of the elderly. In the province of Burdur, where the scale in this study was developed, there were reported to be 12,378 elderly residents at the end of 2017 (TURKSTAT, 2017). The elderly population constituted 14% of the population of the province of Burdur, and this rate is much higher than the average of 8.5% for Turkey in general. Therefore, one of the reasons for conducting this study in Burdur was the high rate of elderly population in the province.

Material and Methods

In this section, the data are presented that were applied for the development of the Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale, the study group is defined, then the development stages of the scale, data collection and validity and reliability studies are described.

Aim

The Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale was prepared with the aim of measuring the physical, environmental and economic risks of patients to be evaluated in the context of home healthcare services.

Study group

The scale form defined the most recent status and the psychometric characteristics of patients aged ≥ 65 years who lived in the city centre and were receiving home healthcare services from a State Hospital (n=261) and individuals aged ≥ 65 years who lived in towns of the province of Burdur who had previously received home healthcare services because of restricted activity/disability (n=245). The mean age of the patients was 79 years (range,

65 – 98 years). Other descriptive information of the patients is given in Table 1.

Scale structure

The Risk Evaluation Scale for Elderly Patients with Home Healthcare comprised 21 dimensions with 21 items scored as 0 = Yes and 1 = No, thereby giving total points of minimum 0 and maximum 21. High points indicate a high risk. Items 5, 6, 8, 14, 27, 29, 35 and 37 were reverse coded. Sample items from the scale are given in Table 2.

Table 1. Some descriptive statistics of participants.

	N	%
Gender		
Female	283	55.49
Male	223	44.1
Marital Status		
Married	284	56.1
Single	55	10.9
Widowed	167	33.0
Living Area		
Rural	75	14.8
Urban	431	85.2
Living Place		
Home	488	96.4
Nursing Home	18	3.6
Education Level		
Illiterate	103	20.4
Literate	49	9.7
Primary	183	36.2
Education		
High School	159	31.4
University and +	12	2.4

The first dimension of the scale is headed “The General Health Status and Physical Autonomy of the Patient”, and the second, “The Suitability of the Living Area of the Patient and the Economic Status”. The final form of the scale that was created after the related analyses is given at the end of this article.

Table 2. Some items of scale.

No	Item	Yes	No
1	The patient can walk independently without any assistive device.		
5	<i>The patient has badsores.</i>		
25	The living area of the patient has the necessary lighting and heating conditions.		
35	<i>There is a lack of income that puts the care of the patient in danger.</i>		

Development of the scale

The first draft of the scale was created by the researchers. This first form comprised 32 items and was reviewed by a total of 6 academicians in this field. Some language and technical corrections were made in accordance with the feedback obtained and 5 items were added to the scale. Thus, a pre-trial form was created of 37 items.

This pre-trial form was applied to a patient group of 80 individuals receiving services from Burdur State Hospital Home Healthcare Services Unit. During this procedure, 9 items were removed from the form as they were not understood, were misunderstood or were not compatible with psychometric characteristics. The remaining 28 items constituted the trial form of the scale. This form was applied to the study group defined in the sample section of the research.

Data collection

Data were collected for validity and reliability studies by administration of the form between 15.11.2017 and 15.03.2018 to patients aged ≥ 65 years who lived in the city of Burdur and were receiving home healthcare services from the State Hospital, and individuals aged ≥ 65 years who lived in towns of the province of Burdur who had previously received home healthcare services. The data were collected by the researchers in the patient's home by observation and in face-to-face interviews with the patient, the patient's carer or the patient's legal representative.

Ethical consideration

This study was approved by Ethics Committee of Mehmet Akif Ersoy University (GO2017/120). During the data collection, attention was paid to ethical rules. Potential participants were given a document explaining that participation was voluntary and the collected data would be used solely for scientific purposes. The informed consent was obtained from the respondents.

Analysis of data and validity and reliability studies of the scale

The content validity studies of the scale form were made in accordance with the feedback received from the 6 academicians. In the evaluation of the content validity made with the "Davis" technique for each item, the comments made by the experts for each item were evaluated as suitable or should be slightly reviewed. None of the experts evaluated any of the items of the scale as "the item should be seriously reviewed" or "the item is not suitable". The content validity index for all the items was calculated as between 0.83 and 1. This indicated an acceptable level as the minimum value is known to be 0.80 (Taşkin, 2010).

To determine the structure validity of the scale, explanatory and factor analysis was applied to determine the dimension structure of the scale. As the scale was scored in the form of yes/no, the explanatory and factor analyses were applied based on the tetrachoric correlation matrix. Chi-square analysis was applied to compare the effectiveness of the scale items in separating high and low-risk

group patients. For the reliability of the scale, the internal consistency of the total and sub-dimension points of the scale items were calculated using the KR-20 formula. The tetrachoric correlation matrix of the scale items was calculated using R program (R Core Team, 2017), polycor software (Fox, 2014). Analyses of the data were made using IBM SPSS version 24 (IBM Statistical Package for Social Sciences-SPSS) and Lisrel 8.7 software (Jöreskog and Sörbom, 2004).

Results

Results related to explanatory factor analysis

To test the suitability of the data obtained for factor analysis of the number and structure, the Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) test and the Bartlett global test were applied before explanatory factor

analysis. The KMO value was found to be 0.603 and the Bartlett global test value was 53613,179 ($p=0.000$). The data were seen to be suitable for factor analysis as a KMO value of >0.60 (Cerny and Kaiser, 1977) and a significant p value ($p<0.05$) are accepted as suitable for factor analysis (Field, 2013). To be able to apply explanatory factor analysis of the trial form consisting of 28 items, first the tetrachoric correlation matrix was obtained and then the explanatory factor analysis was performed. The varimax rotation method was used in the factor analysis. Items with a factor load value of <0.33 , and items in different dimensions with a factor load value of <0.10 difference between these dimensions were removed from the scale. As a result of the analyses applied, a final form of 21 items was reached. The eigen value-component graph of the 21-item final version of the form is shown in Figure 1.

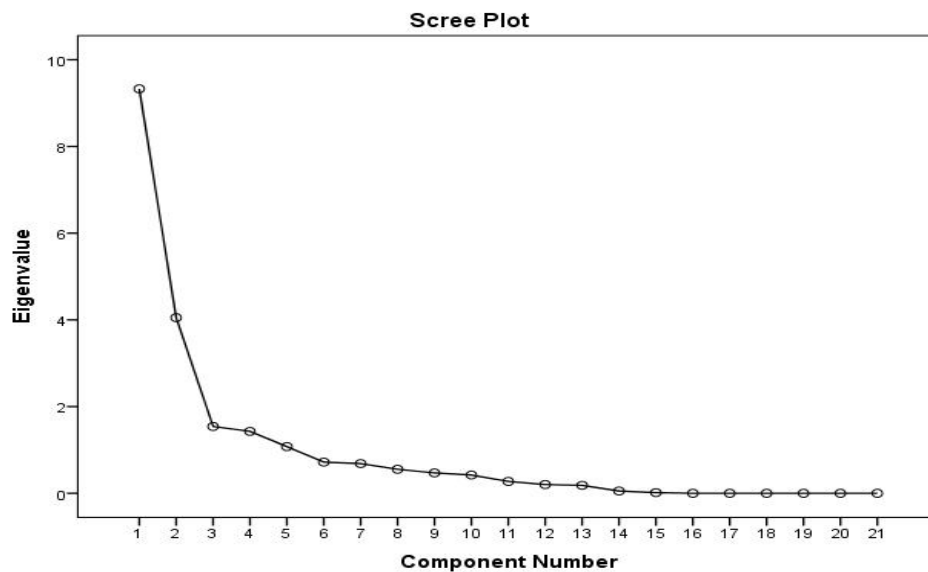


Figure 1. Eigenvalue-component graph.

When the eigen value-component graph was examined, there was seen to be a sharp drop in the first component in respect of eigen values and this fall continued with a slight reduction in the second component. From the second dimension, the reduction in eigen values became stable. It can be

said that the scale has a 2-factor structure based on the scale being constructed as 2 dimensions from the beginning and the continued stabilisation of the change in eigen values in the second dimension. The Eigen Value-Explanatory variance rates obtained for the structure with 2 factors of the 21 items are shown in Table 3

Table 3. Eigen value- explanatory variance rates.

Factor	Eigenvalue	Explained Variance	Total Variance
1	9.315	44.356	44.356
2	4.050	19.288	63.707
3	1.542		
4	1.428		
5	1.077		

As a result of the analysis, there were 5 factors with an eigen value >1, but as explained above, as the scale was designed with 2 dimensions and the reduction in the amount of the decrease in the factor eigen values after the second component, factors were considered with 2 dimensions. The first factor explained 44.356% of the total variance and the second factor, 19.288%, as seen in Table 3. The 2-factor model obtained explained 63.707%

of the total variance. The variance rate explained by a model with more than 1 factor must be >40% to be able to provide structure validity (Büyüköztürk, 2009).

The factor load values obtained as a result of the rotation procedures applied to the final form of the scale are shown in Table 4.

Table 4. Results of the analysis of the rotated basic components.

	Components	
	1st Component	2nd Component
Item 12	.959	
Item 4	.935	
Item 7	.905	
Item 6	.899	
Item 5	.892	
Item 8	.880	
Item 18	.854	
Item 9	.834	
Item 14	.778	
Item 13	.753	
Item 1	.700	
Item 2	.665	
Item 29	.627	
Item 10	.533	
Item 25		.875
Item 27		.807
Item 35		.764
Item 26		.762
Item 24		.724
Item 23		.713
Item 37		.552

Distribution of the items according to the dimensions is shown in Table 4. Of the 24 items in the final form, 14 items (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

12, 13, 14, 18, 29) were seen to remain in the first dimension and 7 items (23, 24, 25, 26, 27, 35, 37) in the second dimension. The load values of the

items ranged between 0.959 and 0.533 in the first dimension and between 0.875 and 0.552 in the second dimension. In the first dimension, the highest factor load was in item 12 and the lowest in item 10. In the second dimension, the highest factor load was in item 25 and the lowest in item 37.

Results related to the differentiating ability of the items

To test the scale items in respect of differentiation of the home healthcare patients as low and high

risk levels, groups were selected of 27% of the patients in the upper and lower level risk groups. The scale items were compared in respect of

differentiation of the upper and lower groups using the Chi-square test. The results obtained are shown in Table 5.

When Table 5 was examined it was seen that all the items in the scale significantly differentiated a 27% lower and upper group. With the exception of item 35, all the other items were significant at the level of 0.001 as a result of the Chi-square test. Item 35 was significant at the level of 0.05. The

results obtained demonstrated that the 21 items in the final form of the scale were able to differentiate those with a high risk of home healthcare from those at low risk. This indicates the structure validity of the scale.

Table 5. The Chi-square results related to the differentiating ability of the scale items

	Sub Group (n)	Upper Group (n)	P
Item 1 (Yes / No)	86/50	136/0	0.000*
Item 2 (Yes / No)	54/82	132/4	0.000*
Item 4 (Yes / No)	2/134	130/6	0.000*
Item 5 (Yes / No)	1/135	104/32	0.000*
Item 6 (Yes / No)	1/135	132/4	0.000*
Item 7 (Yes / No)	47/89	136/0	0.000*
Item 8 (Yes / No)	11/125	136/0	0.000*
Item 9 (Yes / No)	1/135	98/38	0.000*
Item 10 (Yes / No)	20/116	87/49	0.000*
Item 12 (Yes / No)	0/136	129/7	0.000*
Item 13 (Yes / No)	0/136	73/63	0.000*
Item 14 (Yes / No)	6/130	31/105	0.000*
Item 18 (Yes / No)	31/105	2/134	0.000*
Item 29 (Yes / No)	42/94	3/133	0.000*
Item 23 (Yes / No)	63/73	89/47	0.001*
Item 24 (Yes / No)	122/14	79/57	0.000*
Item 25 (Yes / No)	1/135	24/112	0.000*
Item 26 (Yes / No)	4/132	19/117	0.001*
Item 27 (Yes / No)	6/130	29/107	0.000*
Item 35 (Yes / No)	7/129	19/117	0.013**
Item 37 (Yes / No)	15/121	63/73	0.000*

* $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

Results related to confirmatory factor analysis

To examine the structure of the Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale, confirmatory factor analysis was applied to the model obtained

after the explanatory factor analysis. To apply the confirmatory factor analysis, a tetrachoric correlation matrix was calculated, as in the explanatory factor analysis. As the scale items were scored in a paired form as yes/no, Diagonally

Weighted Least Squares (DWLS) were used in the estimations of the model parameters (Muthén, 1984; Muthén & Satorra, 1995). The diagram obtained as a result of the confirmatory factor analysis is shown in Figure 2.

The indexes and statistical compatibility of the model data obtained as a result of the confirmatory factor analysis of the model established with two factors are shown in Table 6.

Table 6. Scale model-data fit statistics and indexes.

χ^2/sd	GFI	AGFI	CFI	RMSEA
3.57	0.98	0.97	1.00	0.071

As seen in Table 6, $\chi^2/sd=3.57$; GFI=0.98; AGFI=0.97; CFI=1.00; N and RMSEA=0.071. According to Kline (2010), when χ^2/sd is ≤ 5 , RMSEA is < 0.08 , and GFI and AGFI values are > 0.90 , it can be said that the model shows acceptable compatibility. Accordingly, when the obtained values were compared with the scale values, the model-data compatibility was seen to be acceptable.

The confirmation of the structure formed with two factors of the model tested with confirmatory factor analysis showed that the Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale can be used.

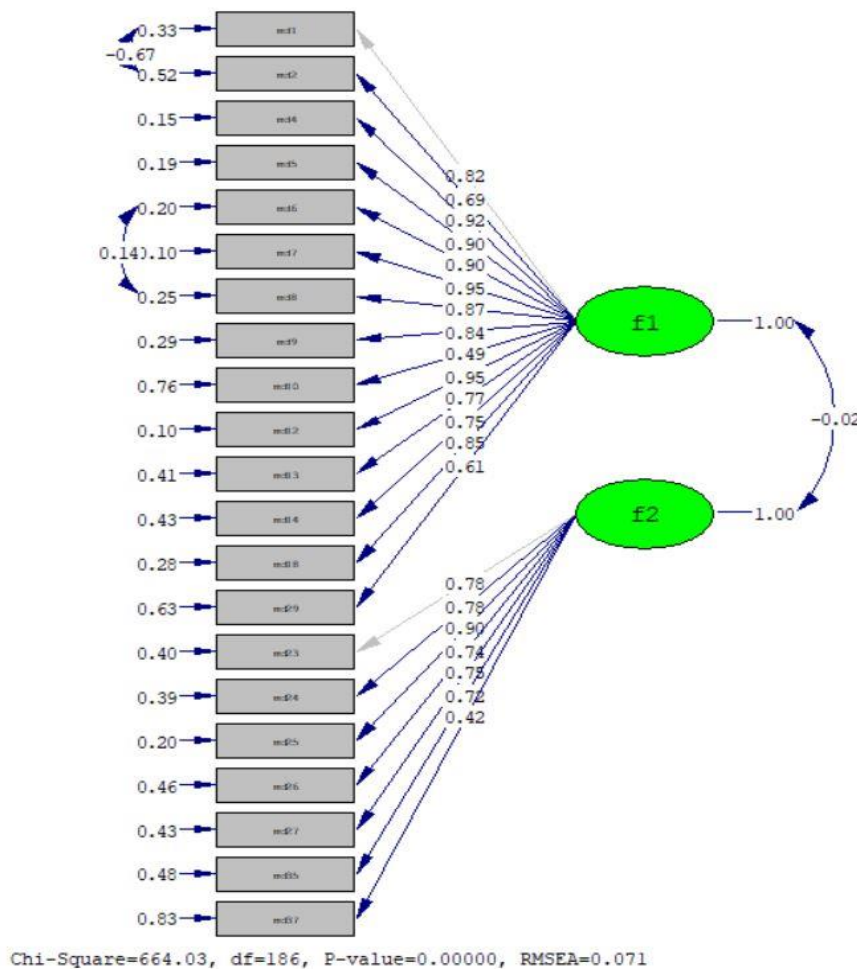


Figure 2. Diagram of the two-factor confirmatory factor analysis.

Reliability Studies of the Scale

To test the reliability of the Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale, the Kuder Richardson-20 (KR-20) internal consistency coefficient (ICC) was calculated. The KR-20 ICC was calculated as 0.895 for the first dimension of the scale, as 0.680 for the second dimension and 0.840 for the whole scale. According to these obtained values, the whole scale can be said to have a sufficient level of reliability.

In conclusion, confirmatory and explanatory factor analysis was applied to the Home Healthcare of Patients Risk Evaluation Scale for structure reliability. The two- dimension model obtained in the explanatory factor analysis was confirmed by the confirmatory factor analysis. Then it was determined that the scale items differentiated patients in a 27% group of high and low risk of home healthcare. Finally, the internal consistency coefficient was calculated for each subdimension and all the scale items and the scale was determined to be reliable for each. As a result of the statistical analyses applied to the scale, it was seen to be sufficient in the context of reflecting the physical, environmental and economic risks of the patients to be evaluated and can be said to be a valid and reliable measurement tool.

Discussion

Due to the increased elderly population, longer life expectancy and increased prevalence of chronic diseases, home healthcare services have started to become more prominent and occupy a greater place in the healthcare system and healthcare insurance system. Home healthcare services in Turkey were introduced in the 2005 publication of "Management of Home Healthcare Services". However, definitive criteria have not been defined on the subject of the presentation of services, limitations or the identification of individuals to receive the services. This is because institutions are attempting to provide services to groups with broader needs in direct proportion to continuously increasing capacities. In Turkey, home healthcare services can be provided by state hospitals, private hospitals, family health centres and by the healthcare teams which have been established in

this field by some local authorities (Official Gazette, 2005).

As the majority of home healthcare patients are elderly individuals, reduced capability of movement and loss of physical function are frequently seen. Together with advancing age, orthopaedic problems and the risk of disability, and associated impaired general health and even confinement to bed are frequently seen problems. Moreover, the prevalence of chronic diseases in elderly patients is higher than in other age groups. Therefore, to be able to follow up the treatment of existing diseases in the elderly is of vital importance and all of these are risk factors for home healthcare of elderly patients (Akgün *et al.*, 2004; Karahan and Güven, 2002).

In a study conducted in the USA, it was reported that the frequency of the need for long-term care increased with age, at 1.4% in those aged <65 years, at 14% in those aged ≥ 65 years, and at 50% >85 years (Rogers and Komisar, 2003). In 1998, 83% of those receiving home healthcare services in Austria, 78% in Germany and 63% in the USA were known to be aged ≥ 65 years (Thome *et al.*, 2003). In studies in Turkey, Subaşı (2001) reported that 42.3% of those receiving care were aged > 65 years and Söylemez (2011) determined this rate as 25.8%. As the vast majority of the patients are elderly, the requirement for home healthcare is a subject discussed throughout the world and supported by studies (Akgün *et al.*, 2004; Turkish State Planning Organisation, 1992). In the current study, the development of a home healthcare scale for use in the elderly population in particular was based on these reasons.

Home healthcare service is a service in which it is attempted to manage several pre-existing or potential patient-related risks. As every individual who receives home healthcare services is different in terms of general health status, physical autonomy, economic status and environmental conditions, the risks that could be encountered during home healthcare are also different from each other. As there is no scientific, objective evaluation procedure in Turkey, and no measurement tool with proven validity and

reliability that includes physical, environmental and economic risks, the identification of who should receive home healthcare services and in what dimension these should be weighted, is unfair and confusing. Japan is one of the most important countries applying targets to determine the requirements and risks of home healthcare and eliminating the unfairness in this area. In the Japanese model, an individual or their family completes a form requesting home healthcare and by measurement tools applied to the patient, the home healthcare patients are separated into 6 groups and thus the need for care is identified including specific services for their needs and the patients are categorized (Ikegami, 1997). In the ASIM system in Europe, the perceptions of the individual of personal safety, physical capabilities, autonomy, residence status and the quality of the place of residence, and functional utility are evaluated with specific scales and forms (Lagergren, 1993). The place where the patient lives is one of the factors directly affecting their health. In a previous study, it was determined that the majority of elderly individuals requesting long-term care preferred their own private place. The vast majority of elderly residents wanted a small private area rather than a large place. It is indisputable that better care will have a positive effect on health and this can be closely related to the physical autonomy of the elderly. Therefore, the physical, social and psychological results of individuals receiving home healthcare services have been found to be valuable (RL Kane and Kane, 2001).

In discussions of long-term care for the elderly, safety and protection have been more emphasized. Professionals, families and even the elderly themselves want extraordinary freedom and independence to receive even normal care. Residential homes do not show any similarity to an individual normal life. Put simply, there are no specific limitations in bedtimes for an individual receiving home healthcare and therefore the suitability of the living areas is of great importance for individuals receiving home healthcare (RL Kane and Kane, 2001). In a study by Donald (2009), a relationship between poor

accommodation and health was determined to be seen in the majority of the elderly as 90% of those over 85 years of age spent their time at home. The elderly are most exposed to the effects of poor housing. In the UK, most houses were not built with the changing needs over a lifetime in mind, but most people prefer to stay in their own home when ageing and ill. Therefore, the second dimension of the scale developed in this study will be of assistance to healthcare personnel and social workers in respect of evaluating the suitability of the living area of the elderly and will cover the deficiencies of the measurement tool to be used in the evaluation of home healthcare patients in Turkey.

Although the scale developed by Gökler *et al.* (2015) in Turkey to identify the requirement for home healthcare services is the only scale that has been developed to identify the requirement for home healthcare of the elderly, it does not sufficiently evaluate the risks related to home care and therefore it is formed of only 9 items and is limited to the physical dimension. As no other scale could be found, it is not possible to have a discussion by comparing the scale developed in this study with others. No other study could be found in Turkey that examines the physical autonomy, general health status, environmental and economic risk factors of individuals requesting home healthcare as a whole. Therefore, the scale formed of 21 items in 2 dimensions developed in this study to eliminate the deficiencies in this field is the first in Turkey and will play an important role in overcoming the problems experienced in the evaluation of home healthcare of patients.

In this study, a home healthcare risk evaluation scale was developed for elderly patients that can be easily used by all units providing home healthcare services. In the context of the statistical results, the first dimension of this newly-developed scale was determined to be suitable for the measurement of the general health status and physical autonomy of the elderly individual who is to receive home healthcare. The second dimension of the scale was found to be suitable for the identification and

measurement of physical, environmental and economic risk factors.

Conclusion

In the scale developed in this study of 21 items in 2 dimensions, as the points increase, so the risk in terms of the requirement for home healthcare of the elderly individual increases. Although the scale measures risks related to home healthcare for the elderly, with the application of further statistical studies, it could be investigated whether the scale is suitable for patients of different age groups who are receiving home healthcare services. In conclusion, this is a scale that can be used and is suitable for the identification of environmental and economic risk factors together with the evaluation of the general health status and physical autonomy of elderly individuals who are to receive home healthcare services.

Limitations

The region in which the study was conducted was limited to the province of Burdur. Individuals in other regions were not contacted. The study data only represent elderly individuals aged ≥ 65 years. Therefore, this research does not reflect the status of home healthcare of patients in all age groups.

Only individuals currently or previously receiving home healthcare services were included in the study.

Disclosure Statement

The authors declare they have no conflict of interest related to the research.

Funding

This study received no funding.

Ethical considerations and Acknowledgements

This study was approved by Ethics Committee of Mehmet Akif Ersoy University (GO2017/120).

During the data collection, attention was paid to ethical rules. Potential participants were given a

document explaining that participation was voluntary and the collected data would be used solely for scientific purposes. The informed consent was obtained from the respondents. The authors declare acceptance of publication guidelines and they have no conflict of interest.

Table 7. Risk Evaluation Scale for Elderly Patients with Home Healthcare.

First Factor: General Health Status of the Patient and Physical Autonomy*		Yes	No
Item 1	The patient can walk independently without any assistive device.		
Item 2	The patient is mobile with some form of device (cane, wheelchair etc).		
Item 4	The patient can turn to the left and right unaided in their own bed.		
Item 7	The patient can meet their toilet and bathroom needs unaided.		
Item 6	Healthcare professionals have recommended that the patient uses an airbed.		
Item 5	The patient has bedsores.		
Item 8	The patient uses incontinence pads.		
Item 18	The patient is able to monitor their own medicines.		
Item 10	The patient can hear easily.		
Item 9	The patient can speak easily.		
Item 12	The patient can eat unaided.		
Item 14	The patient uses nutritional support products.		
Item 13	The patient can be fed orally.		
Item 29	The patient needs continuous care.		

Second Factor: The Suitability of the Living Area of the Patient and Economic Status*

Item 25	The living area of the patient has the necessary lighting and heating conditions.		
Item 27	The accommodation of the patient is a security risk.		
Item 26	The living area of the patient has average hygiene.		
Item 24	The patient has their own private room.		
Item 23	The building where the patient lives has ease of necessary movement.		
Item 35	There is a lack of income that puts the care of the patient in danger.		
Item 37	The patient receives economic support from a public, private or civil society organisation.		

References

- Akgün, S., Bakar, C., & Budakoğlu, İ., 2004.** Trends of elderly population in the world and Turkey: Problems and recommendations. Turkish Journal of Geriatrics, 7(2), 105-110.
- Brent, N. J., 1994.** Risk management and legal issues in home care: the utilization of nursing staff. Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing, 23(8), 659-666.
- Brueckner, G., Pace, D., 1989.** Implementing and Effective Home Care Risk Management Program. Perspectives in Healthcare Risk Management, 9, 25-28.
- Büyüköztürk, Ş., 2009.** Data Analysis Handbook for Social Sciences Statistics, Research Design SPSS Practices and Interpretation (10th ed.). Pegem A Press, Ankara.
- Cerny, B. A., Kaiser, H. F., 1977.** A study of a measure of sampling adequacy for factor-analytic correlation matrices. Multivariate Behavioral Research, 12(1), 43-47.
- Çatak, B., Kılınç, A. S., Badıloğlu, O., Sütlü, S., Sofuoğlu, A. E., Aslan, D., 2012.** Profile of elderly patients who use health services in their homes and in-home care. Turkish Journal of Public Health, 10(1), 13-21.
- Donald, I. P., 2009.** Housing and health care for older people. Age and Ageing, 38 (1), 364-367.
- Field, A. P., 2013.** Discovering statistics using IBM SPSS statistics : and sex and drugs and rock 'n' roll (4th ed.). Sage, Los Angeles.
- Fox, J., 2014.** The 'polycor' package. Documentation available at CRAN. Retrieved from <http://cran.r-project.org/web/packages/polycor/index.html>
- Gökler, E.G., Ünal, E., Aydın, R., Metintaş, S., Işıklı, B., & Önsüz, M.F., 2015.** Developing a Home Health Care Need Scale for the Elderly. Turkish Journal of Geriatrics, 18(3); 231-237.
- Ikegami N., 1997.** Public long-term care insurance in Japan. Jama, 278, 1310-1314.
- Işık, O., Kandemir, A., Akif, M. E., Fidan, C., 2016.** Profile of patients who use home care health services and evaluation of provided service. Hacettepe Journal of Health Administration, 19(2), 171-186.
- Jöreskog, K.G., Sörbom, D., 2004.** LISREL 8.7 for Windows [Computer software]. Scientific Software International, Inc., Lincolnwood, IL.
- Kane, R. L., Kane, R. A. 2001.** What older people want from long-term care, and how they can get it. Health Affairs, 20 (6), 114-127.
- Karahan A., Güven S., 2002.** Yaşlılıkta Evde Bakım, Geriatri, 5(4): 155-159.
- Kline, R.B., 2010.** Principles and practice of structural equation modeling (3rd ed.). Guilford Press., New York.
- Lagergren, M., 1993.** ASIM: a system for monitoring and evaluating the long-term care of the elderly and disabled. Health Services Research, 28(1):27-44.

Markkanen, P., Galligan, C., Quinn, M., 2017. Safety risks among home infusion nurses and other home health care providers. *Journal of Infusion Nursing*, 40(4), 215–223.

Muthén, B. O., 1984. A general structural equation model with dichotomous, ordered categorical, and continuous latent variable indicators. *Psychometrika*, 49, 115–132.

Muthén, B. O., Satorra, A., 1995. Technical aspects of Muthén's LISCOMP approach to estimation of latent variable relationships with a comprehensive measurement model. *Psychometrika*, 60, 489–503.

PQSA 2013. Hazard Identification, Risk Assessment and Control Management. Retrieved from <http://homecareplus.asn.au/wp-content/uploads/Hazard-Identification-Risk-Assessment-and-Control-Management-.pdf> (Access: 20.10.2018)

R Core Team 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/> (Access: 20.10.2018)

Rogers, S., Komisar, H., 2003. Who Needs Long-Term Care? Georgetown University Long-Term Care Financing Project. Retrieved from <http://ltc.georgetown.edu/pdfs/whois.pdf> (Access: 20.10.2018)

Söylemez, M. N., 2011. Home care needs, the level of providing care and affecting factors in

Honaz Population, Denizli. (Unpublished master's thesis). Pamukkale Üniversitesi, Denizli/ Turkey.

Subaşı, N., 2001. Home health care survey in the province of Çankaya, Ankara. (Unpublished doctoral dissertation). Hacettepe Üniversitesi, Ankara/Turkey.

Taşkın, Ç., Akat, Ö., 2010. Araştırma Yöntemlerinde Yapısal Eşitlik Modelleme. Bursa: Ekin Yayınevi.

Thome, B., Dykes, A.K., Hallberg, I.R., 2003. Home care with regard to definition, care recipients, content and outcome: Systematic literature review. *Journal of Clinical Nursing*, 12, 860- 872.

Turkish State Planning Organization 1992. Research on Turkish Family Structure. (Publ. No: DPT 2313). Ankara: B. Atalay, Y. M. Konta, S. Beyazıt, S., & K. Madencioğlu.

TURKSTAT 2016. Türkiye Sağlık Araştırması. <http://www.tuik.gov.tr/PdfGetir.do?id=24573> (Access: 10.05.2018)

TURKSTAT 2017. Merkezi dağıtım sistemi, Ölçümler. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/> (Access: 10.02.2018)

Official Newspaper 2005. Evde Bakım Hizmetleri Sunumu Hakkında Yönetmelik. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/03/20050310-5.htm> (Access: 08.04.2018)

Male Genital Organs in the Red Fox (*Vulpes vulpes*); Macroanatomic and Three-dimensional Reconstruction Aspect

Erkek Kızıl Tilki Genital Organları (*Vulpes vulpes*); Makroanatomik ve Üç Boyutlu Rekonstrüksiyon Görünüşü

Ayşe HALIGÜR¹ , Sema ÖZKADİF^{1*} 

¹Cukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Ceyhan-Adana, Turkey

Abstract: In this study, it was aimed to describe to the genital organs, the macroanatomical aspect and three-dimensional (3D) reconstruction of penis and os penis using multidetector computed tomography (MDCT) images in the male red fox (*Vulpes vulpes*). Six dead male red foxes were used as material. After MDCT images of the penis were obtained, they were reconstructed using a 3D modeling program (Mimics) by overlapping the images. Morphometric measurements were taken from reconstructed model of the penis and os penis. Dissections of foxes were carefully carried out under the loupes. Testis, epididymis and penis were measured from different places. In terms of anatomical aspect, in the red foxes were determined to ovoid testis and extend horizontally into the scrotum. The accessory genital glands were only prostate. The prostate was located to surround the urethra. The spongios body of penis had os penis which the urethra was pass through. The length of the penis obtained by mimics program and digital calliper were not difference. These results may contribute to the lack of the literature about male genital anatomy of the fed fox. It is thought that this study, using 3D reconstruction techniques could make anatomical studies easier to do without harming on wild animals.

Keywords: Genital organs, Anatomy, 3D imaging, Red fox.

Öz: Bu çalışmada, erkek kızıl tilkide (*Vulpes vulpes*) genital organların, makroanatomik görünüşü ve multidedektör bilgisayarlı tomografi (MDBT) görüntülerini kullanarak penis ve os penisin üç boyutlu (3B) rekonstrüksiyonunu ortaya koymak amaçlanmıştır. Materyal olarak altı adet ölü erkek kızıl tilki kullanıldı. Penisin MDBT görüntüleri elde edildikten sonra, görüntüler üst üste bindirilerek bir 3B modelleme programı (Mimics) kullanılarak rekonstrüksiyonu yapıldı. Penis ve os penisin yeniden yapılandırılmış modelinden morfolometrik ölçümler alındı. Tilkilerin diseksiyonu, lupların altında dikkatlice yapıldı. Testis, epididimis ve penis farklı yerlerden ölçüldü. Anatomik açıdan, kızıl tilkilerde testis ovaliği ve skrotuma yatay olarak uzandığı tespit edildi. Genital aksesuar bez olarak sadece prostat tespit edildi. Prostat uretrayı çevreleyecek şekilde yerleştiği görüldü. Pars spongiosa penisde, uretranın içinden geçtiği os penisine sahipti. Mimiks programı ve dijital kumpas ile elde edilen penisin uzunluğu farklılık göstermedi Bu sonuçlar, literatürde tilki erkek genital anatomisi hakkındaki eksikliğin giderilmesine katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, 3B rekonstrüksiyon teknikleri kullanarak vahşi hayvanlara zarar vermeden anatomik çalışmaları yapmayı kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Genital organlar, Anatomi, 3B görüntüleme, Kızıl tilki.

*Corresponding author : Sema ÖZKADİF
Geliş tarihi / Received : 20.09.2019

e-mail : semaerten80@gmail.com
Kabul tarihi / Accepted: 26.11.2019

Introduction

The red fox (*Vulpes vulpes*) has widest distributions of widespread mammals, (Sibirya, Indian, Europe, Asia, North Africa, America, North Pole etc.) (MacDonald, 2005). The fox is a member of the

carnivore and has some characteristic properties such as a slender, like pointed muzzle, prominent

erect ears, long slender legs, and relatively small feet. The foxes are generally categorized according to color in three phase as red (red-brown), across (ashen-gray) and silver (silver-white). The fox is a

very popular animal in carnivores, some of the foxes is feed for post (Demirsoy, 2003).

Reproductive organs are not absolute in each of the animals. However, they have a vital important role in terms of reproduction of species (Massanyi et al., 2003). In most male mammals, reproductive system is studied as histological or reproductive macroanatomy; such as; testis, epididymis, ductus deferens, funiculus spermaticus, accessory glands, penis and preputium: European beaver (Doboszynska and Zurowski, 1981), Anatolian souslik (*Spermophilus xanthoprimum*) (Cakir and Karatas, 2004), dog and cat (Mantis, 2008), Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) (Chaves et al., 2011), Arabian oryx (Eljarah et al., 2012); pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) (Perez et al., 2013), dog (Souza et al., 2014). In addition, 3D reconstruction of penis and clitoris on the mice is studied (Weiss et al., 2012). However, the anatomy of genital system of wild animals, is lacking. According to literature, just one study was encountered related with the development of external genital organs of hyena. (Cunha et al., 2014). Although fox is one of the animal on which there are quite many anatomic and morphometric studies but there is very limited study on genital system. In literature; a study related with internal organs (Cavallini, 1997), on skeleton (Onar et al., 2005; Jurgelenas, 2015), about vomeronasal organs (Karimi, 2016), physiology of reproductive system (Joffre, 1977; Forsberg and Madej, 1990) and there are only morphometric studies about os penis in

literature studies (Gultiken et al., 2004; Canady, 2013). But no studies related to macroanatomy of other genital organs and 3D reconstruction techniques have been found in the red fox. For this reason, it was aimed in this study to describe the macroanatomical aspect of the genital organs and produce a 3D reconstruction of the penis and os penis in the male red fox.

Materials and Methods

This study was performed with permission from the General Directorate of Nature Conservation and National Parks of the Ministry of Forestry and

Water Affairs (Permission number: 38002405-445.05-177733).

This study was carried out on six death male red foxes. These materials were collected at different times as a result of traffic accidents on the road. The body weights of male red foxes were in the range of 6 to 9 kg. The lengths of bodies were measured among 45-50 cm. The animals were kept in the freezer until the obtaining the MDCT images and dissection.

Imaging and 3D reconstruction

MDCT images of animals in prone position were obtained. The parameters of MDCT (Somatom Sensation 64; Siemens Medical Solutions, Germany) device were adjusted as follows: physical detector collimation, 32× 0,6 mm; final section collimation 64× 0,6 mm; section thickness, 1 mm; gantry rotation time, 330 ms; kVp, 120; mA, 300; resolution, 512×512 pixel; and resolution range, 0,92×0,92. Dosage parameters and scanning were performed on the basis of standard protocols and literature (Prokop, 2003; Kalra et al., 2004). By this way, we tried to obtain radiometric resolution at the lowest radiation level and with optimum image quality (MONOCHROME2; 16 bit). High resolution MDCT images of pelvic cavity were obtained. After stocking obtained axial images as DICOM format, they transferred to a computer loaded with 3D modeling program (Mimics 13.1 Materialise Group, Belgium).

The limits of the penis and os penis were determined (Figure1). In the places except the limits of the penis and os penis the erasing process was applied section by section with the computer mouse and these places were cleaned. The images whose limits were determined were overlapped and then reconstruction was performed with 3D translator component of Mimics 13.1 program (Figure 2).

In this study, the length of the os penis, width of the os penis, length of the sulcus urethralis, width of the sulcus urethralis and dorsoventral thickness (middle) were measured (Figure 3). And also length of the penis were measured. After

determining the limits of morphometric measurements of penis and os penis they were automatically calculated by the program.

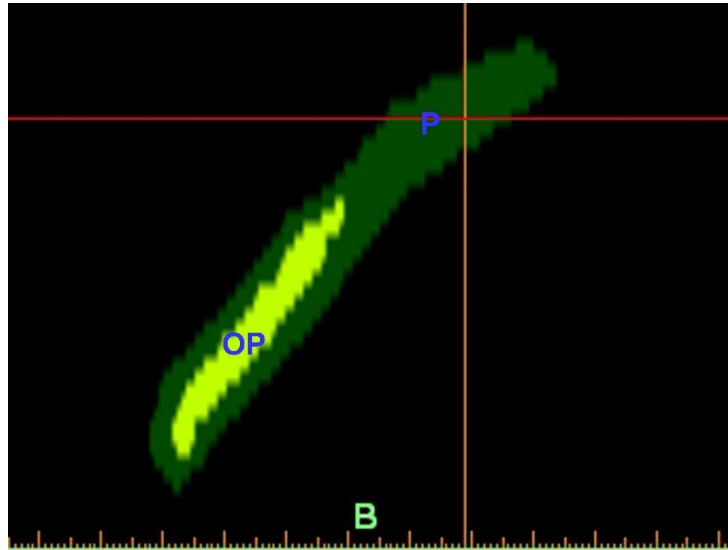


Figure 1: Limitation of penis and os penis on sagittal section. P: penis, OP: os penis.

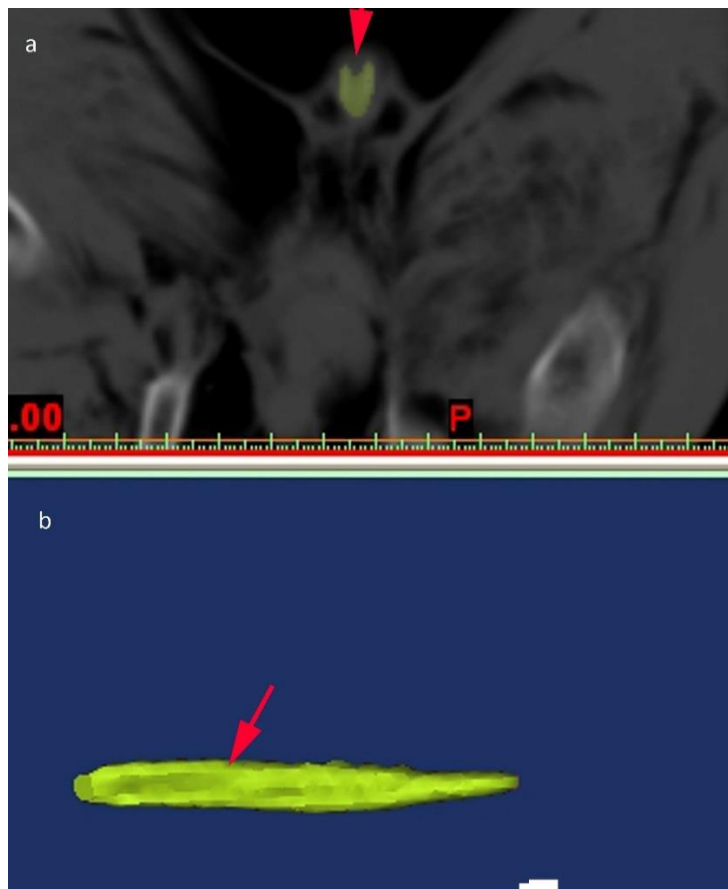


Figure 2: a. Limitation of os penis on transversal section. b. 3D reconstruction of os penis. (^): sulcus urethralis.

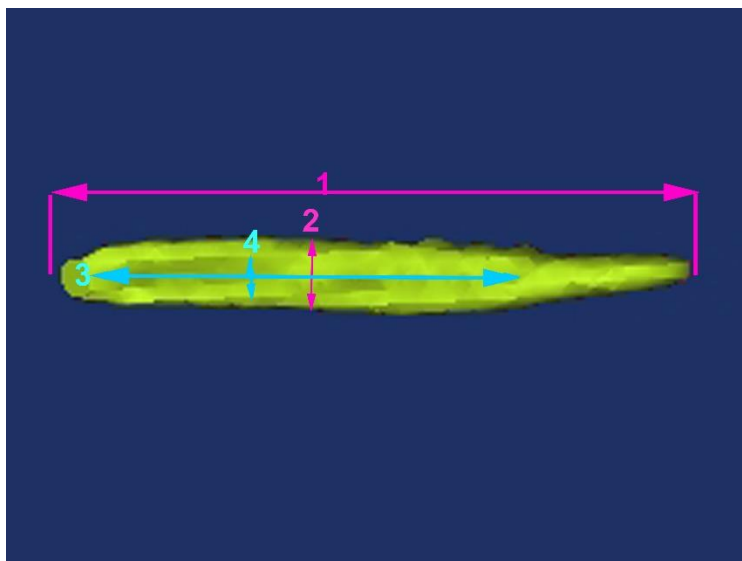


Figure 3: Measurements on facies ventralis of os penis. 1: length of the os penis, 2: width of the os penis, 3: length of sulcus urethralis, 4: width of sulcus urethralis.

Dissection

After obtaining the MDCT images of animals, the simple dissection was performed under loupes. The ventral abdominal wall was removed for each animal. Before, the organs of animals were examined to localization and position.

Width and length of the testis, width of the epididymis, widest of the cauda and corpus epididymis, length of the penis, bulbus glandis, corpus penis and pars libera penis (between pars libera and ostium urethra externum) were measured with digital calliper. The male genital organs were removed to pelvic cavity. Photographs were taken with Canon digital camera. Terms used are in agreement with the Nomina Anatomica Veterinaria (2017).

Results

Dissection

The genital organs belonging to male red foxes were investigated in terms of macroanatomic point of view (Figure 3 and 6). Testis, epididymis and penis were measured from different places (Table

1 and 2). Scrotum was located in the inguinal region near the body and established on it. The scrotum of red foxes were found to be oval and extend horizontally to scrotum. The left testis was determined as larger than the other side (Table 1).

Epididymis was attached along the testis and located on the upper side of testis. Epididymis was divided into three parts. These parts were caput, corpus and cauda epididymis, similar the other animals. For epididymis measures, it was observed that the right side was shorter than the left side (Table 1). Ductus deferens originated from the cauda epididymis. Ductus deferens, musculus cremaster, arteria and vena testicularis was formed to funiculus spermaticus. Funiculus spermaticus was entered to abdomen through the canalis inguinalis and then separated from each other.

Each other elements of funiculus spermaticus was turn to caudal and toward to pelvic cavity.

Accessory genital gland was only prostate in the red fox. It was observed that the shape of the prostate was circular and it surrounded the whole urethra.

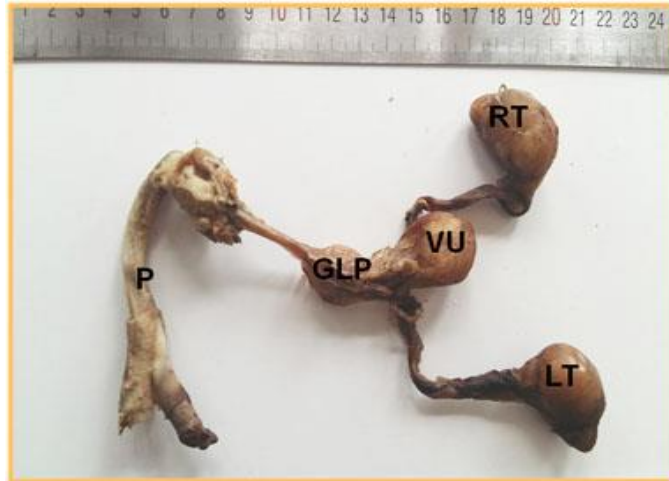


Fig. 4: Dorsal aspect of excised genital organs of the Red fox. GLP: prostate, LT: left testis, RT: right testis, P: penis, VU: vesica urinaria.

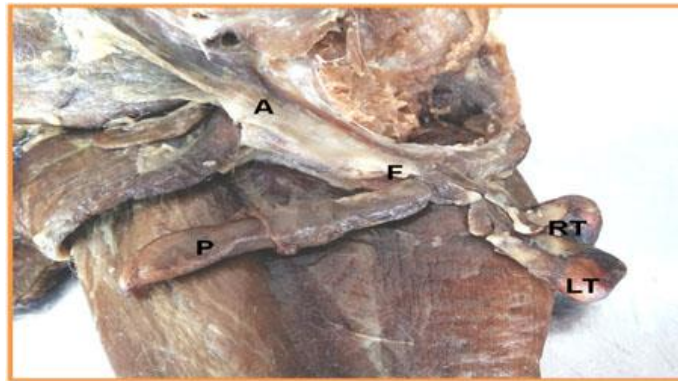


Figure 5: Right aspect of external male genital organs. A: anulus inguinalis, F: funiculus spermaticus, LT: left testis, P: penis, RT: right testis.



Figure 6: Lateral aspect of the penis. CP: corpus penis, GP: glans penis, PR: preputium (internal lamina), RP: radix penis.

Table 1: Morphometry of the testis and epididymis.

Number of foxes	Width of the testis (mm)		Length of the testis (mm)		Width of the epididymis (mm)		Widest of cauda epididymis (mm)		Widest of corpus epididymis (mm)	
	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left
1	19.78	20.12	31.17	32.83	4.32	4.89	10.10	11.77	31.41	31.83
2	18.70	19.05	30.98	31.45	4.27	4.38	10.02	10.98	30.02	30.44
3	19.02	19.22	32.15	32.88	3.99	4.25	9.89	10.38	30.28	30.75
4	19.65	19.97	32.11	32.79	4.21	4.76	10.08	11.12	31.06	31.86
5	19.20	19.86	31.29	31.92	4.29	4.45	10.12	10.92	31.35	31.72
6	18.82	20.01	31.03	31.47	4.30	4.42	10.35	11.07	30.52	30.86

Table 2: Morphometry of penis and part of the penis.

Number of foxes	Length of bulbus glandis (mm)		Length of corpus penis (mm)		Length of pars libera penis (mm)	
	Latero-medial	Dorso-ventral	Latero-medial	Dorso-ventral	Latero-medial	Dorso-ventral
1	9.32	7.42	5.49	6.41	7.71	6.02
2	9.17	7.15	5.30	6.15	7.60	5.97
3	9.20	8.01	5.42	6.33	7.46	5.81
4	8.67	7.35	5.18	6.20	7.29	5.88
5	8.98	7.28	5.11	5.89	6.98	5.67
6	9.14	7.24	5.17	6.24	7.32	5.76

It was determined that the structure of penis consisted of both muscular and cavernous structures. It was observed that this muscular layer started from arcus ischiadicus. It was stated that penis consisted of three sections which are called radix, corpus and glans penis. It was observed that among these sections, radix penis started from arcus ischiadicus as muscular and then shaped the corpus penis. It was determined that penis consisted of both cavernous and spongy layers.

It was observed that the cavernous structure of the penis consisted of an os penis having bony proximal section and gristly distal section through

which urethra can pass. In this channeled bone, it was determined that urethra was present and a spongy structure surrounded the urethra. It was also stated that, it shaped the tip of glans penis, had a circular structure and moreover consisted of two different structures (pars longa glandis and

bulbus glandis). The measurements of pars longa glandis and bulbus glandis are given in Table 2.

Preputium was observed as a skin fold covering the penis. It was determined that this skin fold consisted of two layers such as internal and external.

3D reconstruction

Three dimensional reconstruction of the penis and os penis was performed. The measurement values

of the measurements as shown in Table 3 and 4. The length of the penis obtained by mimics program and digital calliper were not difference (Table 3).

Table 3: Morphometric measurements of red fox penis obtained by digital calliper and mimics program.

Number of foxes	Length of the penis	
	Digital Calliper (mm)	Mimics programme (mm)
1	94.98	94.86
2	93.45	93.39
3	94.72	94.60
4	95.16	95.02
5	94.78	94.67
6	94.56	94.48

Table 4: Morphometric measurements of os penis obtained by mimics program.

Number of foxes	Length of the os penis (mm)	Width of the os penis (mm)	Length of the sulcus urethralis (mm)	Width of the sulcus urethralis (mm)	Dorsoventral thickness (middle) (mm)
1	66.94	6.02	3.15	45.26	3.63
2	65.32	5.71	2.97	43.86	3.48
3	66.84	5.89	3.09	44.78	3.54
4	67.53	6.25	3.37	45.59	3.74
5	66.85	5.87	3.01	45.41	3.61
6	66.76	5.83	3.08	45.35	3.58

Discussion

Scrotum of carnivore was in inguinal region which was parallel to planum medianum (König and Liebich, 2015). It was determined that scrotum of the fox was like the ones in other carnivores and its raphe scroti was not so clear. Scrotum was joined to the body wall through a narrow neck in oryx of ruminants and in a floppily position (Eljarah et al., 2012). Moreover, it was observed that scrotum was not in a floppily position.

Testis volume of dog is significantly larger in the left side than the right side (Souza et al., 2014). Right testis of deer among ruminants (*Ozotoceros bezoarticus*) was heavier than the left one (Perez et al, 2013). Contrary to deer, it was determined the left testis of fox was larger than the right one as in the case of dog.

Just prostate is present in carnivores as accessory gland. Prostate is quite big and constitutes corpus prostatae as a single lobe (Dursun, 2010). Prostate

gland might differ due to its structure and position (Cakır and Karatas, 2004). Prostate gland of a dog has an oval shape dorsal face of which is flattened and is in the caudal of urinary bladder. Urethra passes through a little dorsal in the middle of prostate (Mantis, 2008). For deer and oryx, ampullary glands, vesicular glands and prostate as rarely spread were observed as glandular glands (Perez et al., 2013; Eljaraha et al., 2012). For Anatolian souslik, on the other hand, vesicular gland, prostate and bulbourethral gland are placed at the beginning of urethra (Cakır and Karatas, 2004). Prostate in Anatolian souslik is on the dorsal face of beginning of urethra and as a single lobe on the ventral face of rectum (Cakır and Karatas, 2004). Prostate gland of monkey is like a cone (Prakash et al., 2009). Prostate of a fox, on the other hand, is circular and it was observed that it was in the caudal of urinary bladder as similar to dogs. Moreover, it was stated that urethra passed through the middle of prostate.

Epididymis position and location was seen to similar to other carnivore (Dursun, 2010). While the measurement values belonging to epididymis of deer did not differ for right and left sides (Perez et al, 2013), the measurement values belonging to left epididymis of fox were higher than those of right side.

Glans penis in carnivores is quite long and it elongates on the whole length of os penis (Sisson and Grossman, 1975). It was determined that the same properties were observed for the foxes as in the case of other carnivores. Glans penis carries ostium urethra externum in all mammalian pets except little ruminant (König and Liebich, 2015). Glans penis of fox, which is a wild animal, was observed as coming out with ostium urethra externum. Glans penis of a monkey, on the other hand, is triangular in shape or like a button (Prakash et al., 2009). Penis of a hyena, a wild carnivore, is chisel-shaped (Cunha et al, 2014). It was observed that penis and penis glans of a fox are circular.

Mouse which is a rodentia has an os penis. Os penis constitutes of two sections such as proximal

and distal. Distal section has a structure of fibrocartilaginous whereas proximal section has a bony structure (Weiss et al., 2012). In the study of Canady (2013), it was stated that a cartilaginous structure was not observed on the distal tip of os penis belonging to the fox. The absence of cartilaginous structure might be attributed to the fact that the materials were brought from a museum. In this study, as similar to mouse and according to Gultiken et al. (2004), it was determined that the os penis of the fox has a bony proximal section and cartilaginous distal section. In this study os penis was measured from 3D reconstruction images, length of it 65.32-67.53 mm, width of it 5.71-6.25 mm, and dorsoventral thickness 3.48-3.74 mm. The sulcus urethralis was measured from 3D reconstruction images, length of it 2.97-3.37 mm, width of it 43.86-45.59 mm. Canady (2013) measured with digital calliper as length of the os penis 47.01-63.41 mm, dorsoventral thickness 2.64-4.60 mm, length of the sulcus urethralis 31.02-46.41 mm, width of sulcus urethralis 1.70-3.59 mm, in red fox. In this study morphometric measurement was similar to literature (Canady, 2013).

In this study, macroanatomic and morphometric measurements of male genital organs in red fox were performed. In addition, 3D reconstruction of the penis and os penis was performed and morphometric measurements were taken from the images. The measurements taken from 3D reconstruction images were similar to digital calliper measurements. So it is thought that this study, using 3D reconstruction techniques could make anatomical studies easier to do without harming on wild animals.

Acknowledgement

This paper is based on the poster presentation at the 3rd International VetIstanbul group Congress, 17-20 May, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. The authors thanks to Cukurova University.

References

- Canady, A., 2013.** Variability of the baculum in the red fox (*Vulpes vulpes*) from Slovakia. *Zoology and Ecology* 23, 165–170.
- Cavallini, P., 1997.** Internal organ masses of the red fox *Vulpes vulpes*: data from the wild. *Acta Theriologica* 42, 91-98.
- Chaves, E. M., Aguilera-Merlo, C., Filippa, V., Mohammed, F., Dominguez, S., Scardapane, L., 2011.** Anatomical, histological and immunohistochemical study of the reproductive system accessory glands in male Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomia Histologia Embryologia* 40, 11–20.
- Cunha, G. R., Risbridger, G., Wang, H., Place, N. J., Grumbach, M., Cunha, T.J., Weldele, M., Conley, A. J., Barcellos, D., Agarwal, S., Bhargava, A., Drea, C., Hammond, G. L., Siiteri, P., Coscia, E. M., Mc Phaul, M. J., Baskin, L. S., Glickman, S. E., 2014.** Development of the external genitalia: Perspectives from the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). *Differentiation* 87, 4–22.
- Cakır, M., Karatas, A., 2004.** Histo-anatomical studies on the accessory reproductive glands of the Anatolian souslik (*Spermophilus xanthoprimum*) (Mammalia: Sciuridae). *Anatomia Histologia Embryologia* 33, 146-150.
- Demirsoy, A., 2003.** Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar/Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler) Cilt-III/Kısım-II. 5. Baskı. Meteksan A.Ş. Ankara, pp. 745-750.
- Doboszynska, T., Zurowski, W., 1981.** Anatomical studies of male genital organs of the European beaver. *Acta Theriologica* 26, 331-340.
- Dursun, N., 2010.** Veteriner Anatomi II. Medisan Yayınevi, Ankara. pp.139-160.
- Eljarah, A., Al-Zghoul, MB., Jawasreh, K., Ababneh, M., Alsumadi, M., Alhalah, A., Ismail, Z. B., 2012.** Characterization of male reproductive anatomy of the endangered Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Theriogenology* 78, 159-164.
- Jurgelėnas, E., 2015.** Osteometric analysis of the pelvic bones and sacrum of the red fox and raccoon dog. *Veterinarija ir Zootechnika* 70, 42-47.
- Forsberg, M., Madej, A., 1990.** Effects of melatonin implants on plasma concentrations of testosterone, thyroxine and prolactin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of Reproduction and Fertility* 89, 351-358.
- Gultiken, M. E., Yildiz, D., Bolat, D., 2004.** The anatomy of os penis in red fox (*Vulpes vulpes*). *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 51, 71–73.
- Kalra, M. K., Maher, M. M., Toth, T. L. et al. 2004.** Strategies for CT radiation dose optimization. *Radiology* 230, 619- 628.
- Karimi, H., Hassanzadeh, B., Razmaraii, N., 2016.** Structure of vomeronasal organ (Jacobson) in the male red fox (*Vulpes vulpes*). *Anatomical Science International* 13, 47-54.
- Joffre, M., 1977.** Relationship between testicular blood flow, testosterone secretion and spermatogenic activity in young and adult wild red foxes (*Vulpes vulpes*). *Journal of Reproduction and Fertility* 51, 35-40.
- König, H. E., Liebich, H. G., 2014.** *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals*. 6th. Ed. (Turkish version). pp. 413-428.
- MacDonald, D., Reynolds, J., 2005.** Red fox (*Vulpes vulpes*) (On-line). IUCN Canid Specialist Group Accessed September 27, 2007 at http://www.canids.org/species/Vulpes_vulpes.htm. (05.01.2016)
- Mantis, P., 2008.** Ultrasonography of the urinary and genital system of the dog and cat. *International Journal of Veterinary Sciences* 3, 63-71.
- Massanyi, P., Jancova, A., Uhrin, V., 2003.** Morphometric study of male reproductive organs in the rodent species *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 47, 133-138.
- Nomina Anatomica Veterinaria. 2017.** Prepared by the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 6th ed., Hannover, Columbia, Ghent, Sapporo: World Association of Veterinary Anatomists.
- Perez, W., Vazquez, N., Ungerfeld, R., 2013.** Gross anatomy of the male genital organs of the

pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758).
Anatomical Science International 88, 123-9.

Prakash, S., Suresh, S., Prithviraj, E., 2009.
Anatomical aspects of the male reproductive
system in the bonnet monkey (*Macaca radiata*).
Anatomical Science International 84, 53-60.

Prokop, M., 2003. General principles of MDCT.
European Journal of Radiology 45, 4- 10.

Sisson, S., Grossman, J. D., Getty, R., 1975.
The Anatomy of the Domestic Animals, vol. II,
5th edn. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
pp.1580-1584.

**Souza, M. B., Filho, A. C. M., Sousa, C. V. S.,
Monteiro, C. L. B., Carvalho, G. G., Pinto, J.**

N., Linhares, J. C. S., Silva, L. D. M., 2014.
Triplex doppler evaluation of the testes in dog of
different sizes. Pesquisa Veterinaria Brasileira 34,
1135-1140.

Onar, V., Belli, O., Owen, P. R., 2005.
Morphometric examination of red fox (*Vulpes
vulpes*) from the Van-Yoncatepe Necropolis in
Eastern Anatolia. - International Journal of
Morphology 23, 253-260.

**Weiss, D. A., Rodriquel, E., Cunha, T.,
Menshenina, J., Barcellos, D., Chan, L. Y.,
Risbridger, G., Baskin, L., Cunha, G., 2012.**
Morphology of the external genitalia of the adult
male and female mice as an endpoint of sex
differentiation. Molecular and Cellular
Endocrinology 354, 94-102.

Severe Struvite Urolithiasis in Saanen Kids

Saanen Olaklarında Şiddetli Strüvit Ürolitiyazisi

Mehmet Çağrı KARAKURUM^{1*}  Şima ŞAHİNDURAN¹  Metin Koray ALBAY¹ 

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Burdur, Turkey

Abstract: The owner of a goat flock admitted to our clinic with three intact male Saanen kids (3 months of age) with the complaints of stranguria, anuria, and colic. One kid was totally anuric, the other two was dribbling little urine. Anuric kid was dead shortly after submission. One of the other two kids was dead 4 hours after submission to our clinic and a necropsy was performed on both kids. Several urolithiasis extracted from the cortex, pelvis of kidneys, ureters and bladders. After necropsy, urolith samples were subjected for analysis and reported as struvite. Then, the farm was visited and urine was collected from all kids (n=23) and 15 of them was positive for struvite urolithiasis according sediment examination. Vitamin C (20 mg/kg) as powder was prescribed for four weeks and correction of the ration and gradually increasing the salt content of ration to % 4 was advised. Four weeks later no struvite crystals were seen microscopically. Correction of ration and use of Vitamin C resulted in dissolution of struvite crystals and prevented the further occurrence of urolithiasis. Vitamin C can be used as a safe urine acidifier in kids.

Anahtar Kelimeler: Struvite urolithiasis, Kids, Ration, Vitamin C.

Öz: Bir keçi sürüsünün sahibi kliniğimize üç adet kastre edilmemiş erkek Saanen oğlağında (3 aylık) stranguria, anüri ve kolik şikayetleri ile başvurdu. Bir oğlak tamamen anürikti, diğer ikisinde ise çok az miktarda idrar damlatma vardı. Anürik oğlak getirildikten kısa bir süre sonra öldü. Diğer iki oğlak ise kliniğimize başvurduktan 4 saat sonra öldü ve üçüne de nekropsi yapıldı. Korteks, böbrek pelvisi, üreterler ve mesanelerden birçok taş toplanarak nekropsi sonrası analize tabi tutuldu ve struvit olarak rapor edildi. Daha sonra çiftlik ziyaret edildi ve tüm oğlaklardan (n = 23) idrar toplandı ve bunlardan 15'i sediment muayenesine göre struvit ürolitiyazisi için pozitif. C vitamini (20 mg / kg) toz olarak dört hafta boyunca verildi ve rasyonun düzeltilmesi ile rasyonun tuz içeriğinin kademeli olarak % 4'e yükseltilmesi tavsiye edildi. Dört hafta sonra mikroskopik olarak hiçbir struvit kristali görülmedi. Rasyonun düzenlenmesi ve C vitamini kullanımı, struvit kristallerinin erimesine neden oldu ve daha fazla ürolit oluşumunu engelledi. C vitamini, oğlaklarda güvenli bir idrar asitleştiricisi olarak kullanılabilir.

Keywords: Strüvit ürolitiyazisi, Oğlak, Rasyon, C Vitamini.

*Corresponding author : Mehmet Çağrı KARAKURUM
Geliş tarihi / Received : 13.11.2019

e-mail : mckarakurum@mehmetakif.edu.tr
Kabul tarihi / Accepted: 03.12.2019

Introduction

Urolithiasis is a metabolic disease characterised by formation of calculi within the urinary tract and may cause urethral blockage (Belknap and Pugh, 2002). Urolith formation is considered to have a multifactorial aetiology, however diet has been supposed as the major factor. Ruminants fed rations high in phosphorus, such as cereal grains, commonly develop struvite (magnesium ammonium phosphate) calculi. High

concentration of magnesium in feedlot ration also causes a high prevalence of magnesium ammonium phosphate calculi in lambs (Makhdoomi and Gazi, 2013; Radostits et al., 2005). It is the most common cause of urinary tract disease in goats and sporadic occurrence can affect animal health and welfare. In goats, obstructive urolithiasis commonly seen in young-castrated males due to phosphate salts especially Magnesium ammonium phosphate and calcium

phosphate (Belknap and Pugh, 2002; Smith and Sherman, 2009).

Although uroliths can be found anywhere within the urinary tract, urethroliths are responsible for most clinical problems. Young castrated animals are at the greatest risk because of decreased lumen size of urethra related to a reduction in the circulating androgenic hormones. Due to a shorter and wider urethra in which calculi can pass easily, female goats and kids are not predisposed (Belknap and Pugh, 2002; Radostits et al., 2005; Smith and Sherman, 2009).

Treatment of obstructive urolithiasis is generally surgical to remove uroliths. Management and dietary factors should be considered to establish a preventive approach for urolithiasis such as maintaining calcium to phosphorus ratio of 2:1 in the ration and adding salt to stimulate the water consumption and to increase urine output. Also struvite crystals can be prevented by urine acidification. Generally, ammonium chloride and Vitamin C are advised for urine acidification (Van Metre and Smith 1991, Belknap and Pugh, 2002; Makhdoomi and Gazi, 2013; Mavangira et al., 2010)

The purpose of the present article is to describe clinical course and treatment with Vitamin C in Saanen kids with struvite urolithiasis.

Materials and Methods

The owner of a goat flock admitted to our clinic with three intact male Saanen kids (3 months of age) with the complaints of stranguria, anuria, and colic. One kid was totally anuric, the other two was dribbling little urine. In the anamnesis it was stated that 10 male kids were dead with the same symptoms in 3 days. On physical examination, kids were dehydrated, reluctant to walk and depressed. There was a tight bladder on abdominal palpation. Painful attempts to urinate and vocalizing were observed. One kid had gritty mineral deposits on prepuce. Blood samples (for haemogram and serum biochemistry) and urine via cystocentesis obtained for laboratory analysis. Results were shown in Table 1, 2. Anuric kid was dead shortly after submission and the one of other two was dead 4 hours after submitted to our clinic and a necropsy was performed on both. An intravenous catheter was placed in survived kid and was sedated with diazepam (0.25 mg/kg, IV). Meloxicam (0.6 mg/kg IV) was given for analgesia and hyoscine butylscopolamine (2 mL IV) for its spasmolytic effect. After sedation urethral process was removed and uretra was massaged. Shortly after this manipulation gritty mineral depositions was milked out and urine flow started.

Table 1. Haemogram and Serum Biochemistry Findings

	Kid 1	Kid 2 (Survived)
Leukocyte (x 10 ⁹ /L)	24.000	18.000
Erythrocyte (x 10 ¹² /L)	6.400	6.800
Haematocrit (%)	% 48	%50
Haemoglobin (g/dL)	%14	%13
Urea (mg/dL)	148	151
Creatinine (mg/dL)	8.4	6.9

Table 2. Urinalalysis Findings

	Kid 1	Kid 2 (Survived)
Density	1.015	1.020
Color	Reddish	Reddish
Apperance	Cloudy	cloudy
pH	8.0	8.0
Protein	+++	+++
Keton	+	-
Glucose	-	-
Blood	+++	+++
Microscopy	Numerous erythrocyte, leukocyte and struvite crystals	Numerous erythrocyte, leukocyte and struvite crystals

Results

At the necropsy bladders was intact and distended with reddish urine. Kidneys were enlarged. Several urolithiasis extracted from the cortex, pelvis of kidneys and bladders (Figure 1,2). Also a urolith seen in ureter in anuric kid, which was lead to hidronefrosis (Figure 3). After necropsy, urolith samples were subjected for analysis and reported as struvite.

Then, the farm was visited and urine was collected from all kids (n=23) and 15 of them was positive for struvite urolithiasis according to the urinalysis and sediment examination. It was seen that the

ration given to the kids was random (Low fiber, high grain) and mineralized artesian water was used for water source. Vitamin C (20 mg/kg) as powder was prescribed for four weeks and correction of the ration and gradually increasing the salt content of ration to % 4 was adviced. Urine pH was checked 1 week apart to ensure the urine pH was between 6-6.5. Four weeks later after initiation of Vitamin C therapy, no struvite crystals were seen microscopically. Dietary management and use of Vitamin C resulted in dissolution of struvite crystals and prevented the occurrence of urolithiasis. No other kid was dead in this period.



Figure.1 Uroliths in cortex and pelvis of kidneys

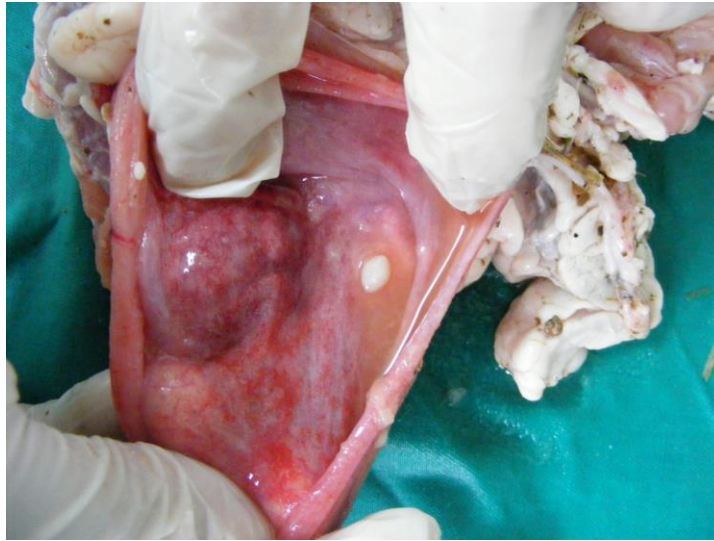


Figure 2. Urolith in bladder

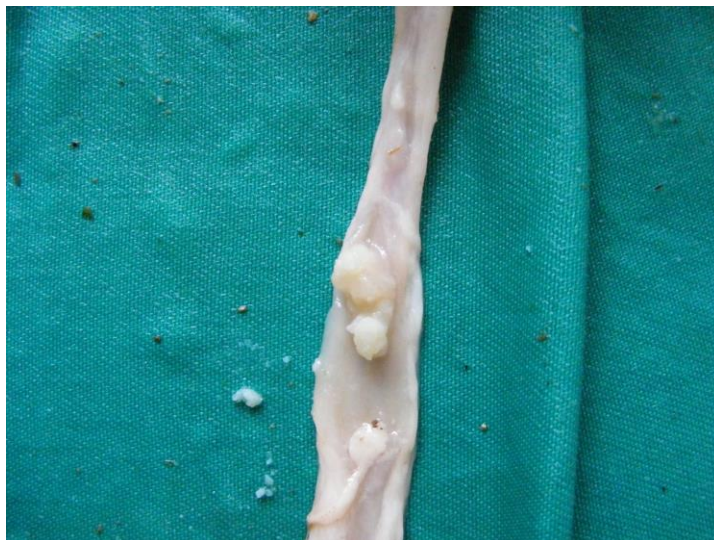


Figure 3. An urolith seen in ureter in anuric kid, which was lead to hidronefrosis

Discussion

Urolithiasis is a common frustrating disorder in both sexes in goats, however urinary blockage is usually seen among males of any age but particularly castrated male goats (Matthews, 2016; Riedi et al., 2018, Videla and Van Amstel 2016). Castration causes interruption of penile development, so the urethra remains narrow

(Belknap and Pugh, 2002; Smith and Sherman, 2009). Although early castration has reported as one of the main causes of urolithiasis in sheep and goats none of the kids in this study was castrated.

Uroliths are formed by precipitation or crystallisation of mineral salts on an organic matrix. Their formation is, therefore, dependent on a number of factors, especially dietary and

environmental. Uroliths in goats and sheep are most commonly reported as phosphatic complexes and calcium salts. Phosphatic complexes include magnesium ammonium phosphate (struvite) and calcium phosphate; occur in alkaline urine; associated with consumption of cereals and pelleted rations. Factors which increase urinary phosphorus excretion increase the risk of the formation of insoluble phosphates and urinary calculi. In ruminants, urinary excretion of phosphorus is normally very low (Matthews, 2016; Radostits et al., 2005). Excess phosphorus is secreted into the digestive system via saliva and excreted in the faeces. But at a certain level the salivary phosphorus recycling system becomes saturated and urinary phosphorus excretion occurs. Low levels of dietary calcium also oppose phosphorus absorption in the intestine. If the dietary calcium:phosphate ratio is low (< 1.5:1) phosphorus absorption and therefore urinary phosphorus load is increased. Low fibre/high grain diets also cause a decrease in amounts of saliva thus decreasing the amount of phosphorus excreted in the faeces. Any reduction in voluntary water consumption will lead to concentrated urine and increased likelihood of calculi formation (Matthews, 2016; Radostits et al., 2005; Videla and Van Amstel 2016). A genetic predisposition to calculi formation has been reported in Saanen males (Matthews, 2016). Random ration is thought to be the biggest source of the problem in this farm. The fact that the farm owner does not receive any nutritional advice support before the problem and that the problem is not repeated when the ration is arranged in order to prevent the re-occurrence of the problem shows that our hypothesis is correct.

Management and dietary factors should be considered to establish a preventive approach for urolithiasis. Providing calcium to phosphorus ratio of 2:1 in the ration and increasing the salt levels to stimulate the water consumption and to increase urine output and urine dilution is essential. Also struvite crystals can be prevented by urine acidification. Generally, ammonium chloride is advised for urine acidification (Van Metre and

Smith 1991, Makhdoomi and Gazi, 2013; Mavangira et al., 2010), however prolonged use of ammonium chloride may cause osteopenia and also not palatable for animals (Radostits et al., 2005; Smith and Sherman, 2009). Vitamin C was reported to obtain satisfactory results in acidifying sheep urine even in small doses (3-4 mg/kg) and has no major side effects (Belknap and Pugh, 2002). In the present study the authors chose the Vitamin C as urine acidifier and checked the acidifier effect 5 day apart. Vitamin C provided a good urine pH of 6-6.5 for four weeks. Also no side effects seen that can be attributed to Vitamin C.

In conclusion, it was seen that struvite urolithiasis may be seen in an early age such as 3 month in non-castrated kids. Dietary management and use of Vitamin C resulted in dissolution of struvite crystals and prevented the occurrence of urolithiasis. Vitamin C can be used as a safe urine acidifier in kids.

References

- Belknap, E.B., Pugh, D. G., 2002.** Diseases of the urinary system. In: Pugh D.G. (Ed). Sheep & goat medicine. Philadelphia: Saunders, pp.267-271.
- Makhdoomi, D.M., Gazi, M.A., 2013** Obstructive urolithiasis in ruminants – A review *Veterinary World* 6(4), 233-238.
- Matthews J., 2016.** Diseases of the Goat. 4th Edition. Wiley-Blackwell.
- Mavangira, V., Cornish, J.M., Angelos, J.A., 2010.** Effect of ammonium chloride supplementation on urine pH and urinary fractional excretion of electrolytes in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 237,1299-1304.
- Radostitis, O.M., Blood, D.C., Gray, G.C., Hinchcliff, K.W., 2005.** *Veterinary Medicine a text book of the disease of cattle, sheep, pig, goat and horse.* Bailliere Tindall, London.
- Riedi, A.K., Knubben-Schweizer, G., Meylan, M., 2018.** Clinical findings and diagnostic procedures in 270 small ruminants with

obstructive urolithiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32,1274–1282.

Smith, M.C., Sherman, D.M., 2009. Goat medicine. 2nd edn. Wiley-Blackwell.

Van Metre, D.C., Smith, B.P., 1991. Clinical management of urolithiasis in small ruminants, Proceedings of the Ninth Annual Forum, American College of Veterinary Internal Medicine, New Orleans, pp 555-557.

Videla R, van Amstel S., 2016. Urolithiasis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 32(3), 687-700.

Isparta İli ve Çevresinde Sığırcılık İşletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması

Serological Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Isparta Province

İlker BİLGİLİ*^{ID}, **Nuri MAMAK²**^{ID}

¹Uluborlu Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü, Isparta, Türkiye

²Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Öz: Bu çalışma, Isparta İli ve çevresinde sığırcılık işletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada, 24 işletmeden toplanan 6 ay -12 yaşlı 460 adet dişi sığır kan serumu kullanıldı. Hayvanlara ait kan örnekleri V. Jugularis'ten 10 ml'lik steril vakumlu tüplere alındı. Tüpler 2000 devirde 10 dk. santrifüj edildi. Serumlar test yapıncaya kadar -25 °C'de derin dondurucuda saklandı. Serumlarda BVDV'una karşı antikor (Ab) varlığını belirlemek için BVDV (Ab)-ELISA, BVDV antijen (Ag) varlığını belirlemek amacıyla BVDV (Ag)-ELISA test kitleri kullanıldı. Alınan kan örneklerinden 346'sı (%75.22) seropozitif, 114'ü (%24.78) seronegatif ve 5 tanesi de (%1.09) persiste enfekte (PI) olarak belirlendi. Holştayn %76.22, Simental %72.22, Montofon ırkında %46.15 oranında seropozitiflik tespit edildi. Irklara göre ve yaş grupları arasındaki seropozitifliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi (p<0.05). Ayrıca yaş arttıkça seronegatifliğin azaldığı saptandı. Bu çalışma, Isparta İli ve çevresinde BVD enfeksiyonunun seroprevalansını tespiti amacıyla yapılan ilk çalışma özelliği taşımaktadır. Sonuç olarak; BVDV enfeksiyonu seropozitiflik ve PI oranı değerlendirildiğinde, enfeksiyonun Isparta İli ve çevresinde yaygın olduğu görülmektedir. Bu nedenle hastalığa karşı gerekli kontrol ve koruma çalışmalarının yapılması bölge ve ülke ekonomisi için önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: BVDV, ELISA, Isparta, seroloji, sığır.

Abstract: The aim of this work is to investigate the seroprevalance of Bovine Viral Diarrhoe Virus (BVDV) infection in the cattle farm in Isparta and its provinces. In the study 460 female bovine serum aged between 6 months-12 years situated in 24 farm were used. Blood samples of the animals from V. jugularis were collected into 10 ml sterile vacuum tubes. Tubes were centrifuged for 10 min at 2000 rpm. Serum samples were stored in a freezer at -25 °C until they used. To determine the presence of BVDV antibodies (Ab) in the serum BVDV (Ab)-ELISA test kits and to determine the presence of BVDV antigen (Ag) in the serum BVDV (Ag)-ELISA test kits were used. Out of 460 obtained blood samples 346 (74.35%) were seropositive, 114 (23.91%) were seronegative and 5 (1.09%) were determined as persistent infected (PI). Seropositivity rate by breeds were determined as 76.22% in Holstein, 72.22% in Simmental and 46.15% in Montofon breed. Seropositivity between breeds and age groups were determined statistically significant (p<0.05). Furthermore, it was detected that as age increases seronegativity decreased. This study is the first study conducted in order to determine the seroprevalance of BVD infection in Isparta and its provinces. As a result; when the seropositivity and PI rates of BVDV infection was considered the infection is widespread in Isparta and its provinces. Therefore, it is important to design control and protection precautions against disease to improve regional and national economy.

Keywords: BVDV, ELISA, Isparta, serology, cattle.

*Corresponding author : İlker BİLGİLİ
Geliş tarihi / Received : 01.11.2019

e-mail : dr.ilkerbilgili@gmail.com
Kabul tarihi / Accepted: 12.12.2019

Giriş

Bovine Viral Diarrhea Virüs (BVDV) enfeksiyonu dünya genelinde yaygın bir patojen olup, sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden

olmaktadır (Ridpath ve ark., 2010; Xue ve ark., 2009). Virüs, çeşitli virülense sahip olup, sığırlarda klinik ve subklinik seyir gösterir. Enfeksiyona

maruz kalan hayvanlarda solunum, sindirim ve genital organlarda ciddi lezyonlar, immünsüpresyon, şiddetli ishal, mukozal hastalık (MD), gebe hayvanlarda abort, yeni doğanlarda konjenital defektler, malformasyonlar ve neonatal mortalite ile seyretmektedir (Greiser-Wilke ve ark., 2003; Rodning ve ark., 2010). Bir sürüde erken embriyonik ölümler, mumifikasyonlar, konjenital malformasyonlar, yavru atmalar, döl tutma problemleri, solunum sistemi enfeksiyonları, ishal, ateş, lökopeni ve trombositopeni gibi bulguların yer alması hastalıktan şüphe ettirir (Decaro ve ark., 2012). Hastalıkta, embriyonik ölüm, fetal mumifikasyon, gebelik oranında düşme, abort, erken doğum, ölü doğum, konjenital defekt, cılız buzağı doğumu ve Persiste enfekte (PI) hayvan doğumu gerçekleşmektedir (Grooms, 2004; McGowan ve ark., 1993; Robert ve ark., 2004). Etkilenen buzağılarda ataksi, geniş tabanlı duruş, sendeleyerek yürüme, kalkmaya çalışırken geriye düşme, katarakt, mikrofalmi, optik nevritis, retinal dejenerasyon, timus hipoplazisi, hipotrikoz, alopesi, sırtlan hastalığı, buklemi kıl örtüsü, brachygnathia, gelişme geriliği, kemik gelişiminde dengesizlik şekillenmektedir (Radositist ve ark., 2006). BVDV kontrol programı olmayan ülkelerde, yaklaşık %1-2 oranında Persiste enfekte (PI) hastalar ile karşılaşılır (Duong ve ark., 2008). Türkiye’de BVDV hastalığının prevalansı %46-86 oranında, persiste enfekte hayvan varlığı ise %0.07-4.9 arasında değişmektedir (Avcı ve Yavru, 2013). Bu çalışmada, Isparta İli ve çevresinde sığırcılık işletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Kan Örnekleri

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 06.03.2014 tarih ve 01 sayılı kararı ile etik kurul izni alındı. Çalışma, Isparta ili ve çevresinde 24 adet farklı işletmeden 6 ay ile 12 yaş arasında BVDV aşısı uygulanmamış sağlıklı görünüme sahip 460 tane dişi sığır ile yürütüldü.

Vena jugularis’ten 10 ml kan uygun şekilde alındı. Kanlar 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çıkarılan serumlar -25°C’de çalışma yapılincaya kadar saklandı.

ELISA Testi

BVDV (Ab)-ELISA (IDEXX BVDV-Total Ab, Switzerland) ve BVDV (Ag)-ELISA (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, Switzerland) kitleri kullanıldı. Kan serumları ve kitte kullanılan kimyasallar oda sıcaklığına gelecek şekilde ortalama 1 saatlik zaman diliminde oda sıcaklığında bekletildi.

BVDV (Ab) Testi

Serumlar BVDV ’ye karşı gelişen antikor varlığı yönünden indirekt ELISA (BVDV (Ab)-ELISA (IDEXX BVDV-Total Ab, Switzerland) ile incelendi.

BVDV (Ag) Testi

Elde edilen serum örnekleri BVDV antijen varlığı yönünden direkt ELISA (IDEXX, BVDV Ag test, Switzerland) ile incelendi.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, ırklar ve yaş grupları arasında Chi-Square (X²) testi (Minitab 16 statistical software, USA) ve korrelasyon testi (Minitab 16 statistical software, USA) ile istatistiksel analizleri yapıldı. p<0.05’ten küçük olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

ELISA Sonuçları

ELISA test kiti kullanılarak 460 adet sığırdan yapılan çalışmada 342 adet seropozitif (%74.35), 110 adet seronegatif (%23.91), 8 adet (%1.74) şüpheli bulundu. Şüpheli hayvanlardan 45 gün sonra tekrar kan alındı ve test yapıldı. Şüpheli olan 8 hayvanın 4 tanesi seropozitif, 4 tanesi seronegatif olarak tespit edildi. Kan örneklerinin, serolojik olarak sayısal ve oransal dağılımları Tablo 1 ve Tablo 2’de sunulmuştur.

İlçeler bazında serolojik bulgular değerlendirildiğinde; Atabey ilçesinden 40 adet kan alındı, 36 (%90) tanesi seropozitif, 4 (%10) tanesi seronegatif olarak bulundu. Eğirdir ilçesinden 37 adet kan alındı, 32 (%86.49) tanesi seropozitif, 5 (%13.51) tanesi seronegatif bulundu. Gönen ilçesinden 48 adet kan alındı, 42 (%87.50) tanesi seropozitif, 6 (%12.50) tanesi seronegatif bulundu. Keçiborlu ilçesinden 49 adet kan alındı, 42 (%85.71) tanesi seropozitif, 7 (%14.29) tanesi seronegatif tespit edildi. Senirkent ilçesinde 63 adet kan alındı 52 (%82.54) tane seropozitif,

11 (%17.46) tane seronegatif belirlendi. Şarkikaraağaç ilçesinden 103 adet kan alındı 77 (%74.76) tane seropozitif, 26 (%25.24) seronegatif bulundu. Yalvaç ilçesinden 111 adet kan alındı 57 (%51.35) tanesi seropozitif, 54 (%48.65) tanesi seronegatif, Isparta ili merkezinde ise 9 tane kan alındı 8 (%88.89) tanesi seropozitif, 1 (%11.11) tane seronegatif tespit edildi. Oransal dağılımlar Tablo 2' de sunulmuştur. (Tablo 2)

Tablo 1. Kan serumlarının serolojik olarak sayısal ve oransal dağılımı.

Serolojik Sonuç	Hayvan Sayısı	Oran (%)
Seropozitif	346	75.22
Seronegatif	114	24.78
Toplam	460	100

Tablo 2. Isparta ili ve çevresinde kan örneği alınan yerlerin örnek sayıları, serolojik olarak sayıları ve oransal dağılımı.

Örnek Alınan Yerler	Seropozitif		Seronegatif		Toplam Örnek Sayısı
	Hayvan Sayısı	% Değer	Hayvan Sayısı	% Değer	
Merkez	8	88.89	1	11.11	9
Atabey	36	90	4	10	40
Eğirdir	32	86.49	5	13.51	37
Gönen	42	87.50	6	12.50	48
Keçiborlu	42	85.71	7	14.29	49
Senirkent	52	82.54	11	17.46	63
Şarkikaraağaç	77	74.76	26	25.24	103
Yalvaç	57	51.35	54	48.65	111
Toplam	346		114		460

Serolojik bulguların ırklara göre dağılımı incelendiğinde; holştayn ırkı sığırlardan 429 adet numune alınmış olup 327 (%76.22) tanesi seropozitif, 102 (%23.78) seronegatif olarak tespit edildi. Simental ırkı sığırlardan 18 adet kan numunesi alındı 13 (%72.22) tanesi seropozitif, 5 (%27.78) tanesi seronegatif bulundu. Montafon ırkından 13 tane kan numunesi alındı 6 (%46.15)

tanesi seropozitif, 7 (%53.85) tanesi seronegatif olarak belirlendi. Seropozitif ve seronegatif hayvanların ırklara göre sayısal ve oransal dağılımı tablo 3'te sunulmuştur. (Tablo 3)

Serolojik bulguların, yaş aralığına göre dağılımında 6 ay-3 yaş grubu arasında 146 adet hayvandan 74 (%50.68) tanesi seropozitif, 72 (%49.32) tanesi

seronegatif, 3-6 yaş grubu arasında 207 hayvandan 170 (% 82.13) tanesi seropozitif, 37 (%17.87) tanesi seronegatif; 6 yaş ve üzerindeki grup arasında ise 107 hayvandan 102 (%95.33) tanesi seropozitif, 5 (%4.67) tanesi seronegatif olarak belirlendi. Seropozitif ve seronegatif hayvanların yaş grupları arasında sayısal ve oransal dağılımı Tablo 4'te sunulmuştur. (Tablo 4)

Çalışmada, Eğirdir ilçesinde 1 tane, Gönen ilçesinde 1 tane, merkezde 1 tane ve Senirkent

ilçesinde bir işletmede 2 tane olmak üzere Isparta ili ve çevresinde 460 adet dişi sığırdan 5 (%1.09) tanesi antijen pozitif bulundu. 45 gün sonra antijen pozitif olan hayvanlardan ikinci kez kan numunesi alınarak antijen arandı. 5 hayvanda yine antijenin pozitif olduğu tespit edildi ve bunlar persiste enfekte hayvan olarak değerlendirildi. Antijen pozitif olan hayvanların Isparta İli ve çevresine göre oransal dağılımı Tablo 5'te sunulmuştur. (Tablo 5)

Tablo 3. Seropozitif ve seronegatif hayvanların ırklara göre sayısal ve oransal dağılımı.

İrk	Seropozitif		Seronegatif	
	Hayvan Sayısı	% Değer	Hayvan Sayısı	% Değer
Holştayn	327	76.22	102	23.78
Simental	13	72.22	5	22.78
Montafon	6	46.15	7	53.85
Toplam Sayı	346		114	

Tablo 4. Seropozitif ve seronegatif hayvanların yaş grupları arasında sayısal ve oransal dağılımı.

Yaş	Seropozitif		Seronegatif	
	Hayvan Sayısı	% Değer	Hayvan Sayısı	% Değer
6 ay-3 yaş	74	50.68	72	49.32
3-6 yaş	170	82.13	37	17.87
6 yaş ve Üzeri	102	95.33	5	4.67
Toplam Sayı	346		114	

Tablo 5. Antijen pozitif olan hayvanların Isparta İli ve çevresine sayısal ve oransal dağılımı.

Antijen Pozitif Olan Yerler	Antijen Pozitif Hayvan Sayısı	Hayvan sayısı	Oran (%)
Merkez	1	9	11.11
Atabey	-	40	-
Eğirdir	1	37	2.70
Gönen	1	48	2.08
Keçiborlu	-	49	-
Senirkent	2	63	3.17
Şarkikaraağaç	-	103	-
Yalvaç	-	111	-
Toplam	5	460	1,09

İstatistiksel Değerlendirme

Laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında yaş grupları ve ırklar arasında istatistiksel açıdan farkın olup olmadığı Chi-Square (X^2) Test'i kullanılarak belirlendi. Tablo 6 ve Tablo 7'de sunulmuştur. (Tablo 6 ve 7)

Tablo 6'da görüldüğü gibi yaş grupları arasında ($p<0.05$) istatistiksel önem belirlendi. Ayrıca, yaş ile

seropozitif ve seronegatiflik arasındaki korrelasyon testine göre yaş arttıkça seronegatifliğin azaldığı saptandı.

Holştayn, Simental, Montafon ırklar arasında da istatistiksel önem belirlendi ($p<0.05$). Tablo 7'de yapılan harflendirmeye göre değerlendirme yapıldığında, farklı harfler taşıyan gruplar arasında fark önemlidir.

Tablo 6. Yaş grupları arasında X^2 testi istatistik tablosu.

Yaş	n	Seropozitif (n)	Seronegatif (n)	%	P değeri
6 ay- 3 yaş	146	74	72	50.68	*
3 – 6 yaş	207	170	37	82.13	*
6 yaş ve üzeri	107	102	5	95.33	*

* $P<0.05$

Tablo 7. Irklar arasında X^2 testi istatistik tablosu.

İrk	n	Seropozitif (n)	Seronegatif (n)	%	Harflendirme
Holştayn	429	327	102	76.22	a
Simental	18	13	5	72.22	ab
Montafon	13	6	7	46.15	b

Chi-Square=6.211 $p= 0.045$

Tartışma

Bu çalışmada, hayvan sahiplerinden alınan anamnezlerde ölü doğumlar, gelişme geriliği, kongenital defekt, cıvz buzağı doğumu, değişken morbiditeli pnömo-enterit, döl tutma problemlerinde artış olduğu bilgisine ulaşıldı. Bu klinik bulgular; birçok viral, bakteriyel hastalıkların yanı sıra beslenme yetersizlikleri gibi nedenlerden de kaynaklanabilir. Fakat bu çalışmada, BVDV enfeksiyonu seroprevalansının %75.22 ve PI oranının %1.09 olarak tespiti, bu klinik bulguların BVDV enfeksiyonundan kaynaklandığının önemli bir göstergesidir.

BVDV' nin prevalansı, dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermekte ve %12-89 arasında olduğu bildirilmektedir (Kuta ve ark., 2013).

Ülkemizde BVDV seroprevalansı araştırmalarında; Aydın Yöresinde %86 (Tan ve ark., 2006), Burdur'da %76-81.5 (Kale, 2007; Öztürk ve ark., 2012), Konya ve çevresinde %90.63 (Kayacan ve Yapıcı, 2008), Afyonkarahisar'da %84.6 (Erol ve ark., 2014), Samsun, Sivas, Tokat İllerinde %20.19 (Yazıcı ve ark., 2007), Muğla ili ve çevresinde %49.9 (Şişman ve Akkan, 2008) seropozitiflik rapor edilmiştir.

Bu çalışmada ise BVDV enfeksiyonu seroprevalansı %75.22 oranında tespit edildi. Bu oran Isparta'ya komşu olan Burdur bölgesindeki seropozitiflik (Kale, 2007; Öztürk ve ark., 2012) değerine yakın iken, Aydın (Tan ve ark., 2006), Konya (Kayacan ve Yapıcı, 2008), Afyonkarahisar (Erol ve ark., 2014) illerinde belirlenen seroprevalanstan düşük, Samsun, Sivas, Tokat (Yazıcı ve ark., 2007) ve Muğla (Şişman ve Akkan, 2008) illerindeki seroprevalanstan yüksektir. Bu farklılıklar; araştırmada kullanılan test yöntemlerinin farklı olmasından, materyallerin toplandığı işletmelerde PI hayvan varlığının olup olmadığından, bölgelerdeki hayvan hareketlerinin çok veya az olmasından ve hastalığa karşı herhangi bir koruyucu önlem alınıp alınmadığından kaynaklanabilir. Persiste hayvanların sürü içerisinde yaygınlığı dünya genelinde %1-2 oranındadır (Houe, 1999; Wittum ve ark., 2001). Bir sürüde seropozitiflik oranının yüksek olması o sürü içerisinde PI hayvanın varlığının göstergesi sayılmaktadır (Houe, 1999).

Houe ve Meyling (1991) tarafından Danish sütçü sürülerinde yaptıkları çalışmada, %1.4 oranında PI hayvan tespit etmişlerdir. Hashemi Tabar ve ark. (2010) tarafından, İran'da abort yapmış ineklerden topladıkları serum örneklerinde %1.67 oranında PI hayvan belirlemişlerdir.

Ülkemizde, Burgu ve ark. (2003) tarafından Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan 26 süt sığırcılığı işletmesinde persiste enfeksiyon oranını %0.61-0.83, Şimşek ve Öztürk (1997) tarafından Konya'da %0.7, Bulut ve ark. (2006) tarafından Konya bölgesinde %0.1, Ak ve ark. (2002) tarafından Trakya yöresinde %3.07, Tan ve ark. (2006) tarafından Aydın ili ve çevresinde %4.9 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, 460 tane hayvandan 5 tanesi (%1.09) persiste enfekte (PI) olarak belirlendi. Çalışmada tespit edilen PI oranı dünya genelinde bildirilen oranlarla uyumlu iken (Hashemi Tabar ve ark., 2010; Houe, 1999; Houe ve Meyling, 1991; Wittum ve ark., 2001), ülkemizde belirlenen PI oranları ile farklılık göstermektedir (Ak ve ark., 2002; Burgu ve ark., 2003; Şimşek ve Öztürk 1997, Tan ve ark.

2006). PI oranının ülkemizdeki bazı çalışmalarda düşük olması, araştırma bölgelerinde daha önce yapılan araştırmalarda tespit edilen (Bulut ve ark., 2006; Şimşek ve Öztürk, 1997) PI hayvanların eradike edilmesinden, PI oranının yüksek olması (Ak ve ark., 2002; Tan ve ark. 2006) ise bölgelerde PI enfekte hayvan tespiti ile ilgili araştırmanın az olması ve hastalıkla ilgili yeterli koruma ve kontrol önlemlerinin alınmadığından kaynaklanabilir.

Hastalığın seroprevalansı ırklara göre değerlendirildiğinde; holştayn ırkı sığırlardan alınan 429 adet kan numunesinin 327 (%76.22) tanesi seropozitif, 102 (%23.78) seronegatif bulundu. Simental ırkı sığırlardan alınan 18 adet kan numunesinin 13 (%72.22) tanesi seropozitif, 5 (%27.78) tanesi seronegatif tespit edildi. Montafon ırkından alınan 13 tane kan numunesinin 6 (%46.15) tanesi seropozitif, 7 (%53.85) tanesi seronegatif olarak saptandı. Holştayn, Simental, Montafon ırkları arasında da (X^2) testine göre istatistiksel önem belirlendi ($p < 0.05$). Şişman ve Akkan (2008) tarafından yapılan araştırmalarında, ırk yönünden montafon ırkı ile holştayn, simmental ve melez ırklar arasında istatistiksel önemin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, İssi ve ark. (2006), BVDV enfeksiyonunda saf ırkların etkene karşı serum nötralize antikor ürettiklerini, hastalarda çoğunlukla birkaç günde iyileşme olduğunu ve hastalığın subklinik ilerlediğini bildirmişlerdir.

Mockeliuniene ve ark. (2004) tarafından yapılmış olan bir araştırmada yaş arttıkça seropozitiflik yüzdesinin arttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, BVDV enfeksiyonunun seroprevalansının yaş aralığına göre dağılımında 6 ay-3 yaş grubu arasında 146 adet hayvandan 74 (%50.68) tanesi seropozitif, 72 (%49.32) tanesi seronegatif, 3-6 yaş grubu arasında 207 hayvandan 170 (% 82.13) tanesi seropozitif, 37 (%17.87) tanesi seronegatif; 6 yaş ve üzerinde ki grup arasında ise 107 hayvandan 102 (%95.33) tanesi seropozitif, 5 (%4.67) tanesi seronegatif olarak belirlendi. Yaş grupları arasında en düşük seropozitiflik yüzdesi 6 ay-3 yaş grubu arasında %50.68, en yüksek seropozitiflik 6 yaş ve üzeri

olan grupta %95.33 olarak tespit edildi. Yaş grupları arasında ($p < 0.05$) istatistiksel önem belirlendi. Ayrıca yaş ile seropozitif ve seronegatiflik arasındaki korrelasyon testine göre yaş arttıkça seronegatiflik azaldığı saptandı. Diğer bir ifadeyle, çalışmada yaş arttıkça seropozitiflik yüzdesinin arttığı görülmüş olup bu durum Mockeliuniene ve ark. (2004) tarafından yapılan araştırma ile uyumludur.

Sonuç

Çalışmanın bulgularına göre; Isparta İli ve çevresinde sığırcılık işletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) Enfeksiyonu için %75.22 oranında seropozitiflik ve %1.09 oranında persiste enfekte (PI) hayvan belirlenmiştir. Sonuç olarak; BVDV enfeksiyonunun seropozitiflik ve PI oranı değerlendirildiğinde, enfeksiyonun Isparta İli ve çevresinde yaygın olduğu görülmektedir. Bu nedenle hastalığa karşı gerekli kontrol ve koruma önlemlerinin alınması bölge ve ülke ekonomisi için önem arz etmektedir.

Moennig ve ark. (2005) tarafından PI hayvanların sürüden çıkarılmasını önermektedirler. Çalışmada, PI hayvan olarak değerlendirilen 5 tane hayvan için işletme sahiplerine, bu hayvanların kesime sevk edilmesi önerilmiştir.

Persiste enfekte hayvanların identifikasyonu ve eliminasyonu, aşılama yoluyla BVDV enfeksiyonuna karşı immünitinin artırılması, biyogüvenlik tedbirlerin geliştirilmesi ve uygulanmasını içeren 3 ana ilke üzerine kontrol programlarına odaklanılmalıdır (Walz ve ark., 2010).

Türkiye’de BVD hastalığına karşı henüz belli başlı bir koruma kontrol programı uygulamaya konulmamıştır. Piyasada inaktif BVDV aşısı mevcut olsa da yeteri kadar uygulama alanı bulamamaktadır.

Dünya üzerinde enfeksiyonun yüksek prevalansa sahip olması, ülke ve dünya hayvancılığına ciddi etkileri olması açısından topyekün koruma kontrol programlarının uygulanması gerekmektedir.

Bu çalışmada yüksek seropozitiflik belirlenmiştir. Hastalıktan arı olmayan hayvanların il ve ilçeler arası hareketleri hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır. Isparta’ya komşu olan Burdur, Afyonkarahisar, Konya İlleri arasında hayvan hareketleri çok fazla olmaktadır. Isparta, Burdur, Afyonkarahisar, Konya İllerinde de seroprevalansın yüksek olması bunun kanıtı olabilir.

Viral etkenler evcil hayvanlarda oluşturdukları enfeksiyon neticesinde tedavi masraflarında artış, verim düşüklüğü ve ölüme bağlı kayıplar sebebiyle ekonomik önem arz etmektedirler (Yıldırım ve Burgu, 2005). Bu yüzden BVDV enfeksiyonu Türkiye’de mücadele edilmesi, koruma ve kontrol programları uygulanması gereken ciddi bir hastalıktır.

Teşekkür

Bu çalışma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından Yüksek Lisans Tez Projesi olarak desteklenmiştir. (Proje No: 0233-YL-14).

Kaynaklar

Ak, S., Fırat, İ., Bozkurt, H.H., Gülyaz, V., Ak, K., 2002. The prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle and existence of persistently infected cattle in the Trakya Region. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 26, 245-248.

Avcı, O., Yavru, S., 2013. Investigation of Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpesvirus-4 in a dairy herd with naturally infected in Konya. Eurasian Journal Veterinary Science 29, 82-86.

Bulut, O., Yavru, S., Yapıkçı, O., Kale, M., Avcı, O., Hasırcıoğlu, S., 2006. Sütçü sığırların bovine herpesvirus 1 (BHV-1) ve bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonları yönünden elisa ile araştırılması. Hayvancılık Araştırma Dergisi 16(2), 18-24.

Burgu, İ., Alkan, F., Özkul, A., Yeşilbağ, K., Karaoğlu, T., Güngör, B., 2003. Türkiye’de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 50, 127-133.

Decaro, N., Mari, V., Lucente, M.S., Sciarretta, R., Moreno, A., Armenise, C., Losurdo, M., Camero, M., Lorusso, E., Cordioli, P., Buonavoglia, C.,

2012. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Veterinary Microbiology* 155, 165-171.

Duong, M.C., Alenius, S., Huong, L.T.T., Björkman, C., 2008. Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *Veterinary Journal* 175(3), 390-394.

Erol, N., Gür, S., Acar, A., 2014. A Serological investigation for Bovine Viral Diarrhea Virus infection in and around Afyonkarahisar province. *West Anatolia. Kocatepe Veterinary Journal* 7(1), 17-21.

Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Moennig, V., 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals journal* 31, 113-118.

Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 20, 5-19.

Hashemi Tabar, G.R., Haghparast, A., Naseri, Z., 2010. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies and antigen among the aborted dairy cows in industrial dairy cattle herds in Mashhad Area-Iran. *World Applied Sciences Journal* 8(5), 635-640. 10

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64(2-3), 89-107.

Houe, H., Meyling, A., 1991. Prevalence of Bovine Virus Diarrhoea (BVD) in 19 Danish Dairy Herds and Estimation of Incidence of Infection in Early Pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine* 11, 9-16.

Houe, H., Lindberg, A., Moennig, V., 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18, 427-436.

İssi, M., Gülaçtı, İ., Kızıl, Ö., Karapınar, T., Bulut, H., Gül, Y., 2006. Kliniğimizde gözlemlenen reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile doğrulanan mukoza hastalığı olguları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 20(3), 253-258.

Kale, M., 2007. Sığırlarda Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Fertilité ile İlişkinin Araştırılması. TÜBİTAK Projesi, Proje No: 106O366 Burdur, s. 1-116.

Kayacan, G., Yapıcı, O., 2008. Konya İli ve çevresinde bulunan süt sığırcılığı işletmelerinde ki hayvanlara ait kan ve süt serumlarında Bovine Viral Diarrhoea (BVDV)'una karşı oluşan antikorların ELİSA

ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Kuta, A., Polak, M.P., Larska, M., Zumudzinski, J.F., 2013. Monitoring of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in Polish dairy herds using bulk tank milk samples. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57, 149-156.

McGowan, M., Kirkland, P., Richards, S., Littlejohns, I., 1993. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Veteriner Record* 133, 39-43.

Mockeliuniene, V., Salomskas, A., Mockeliunas, R., Petkevicius, S., 2004. Prevalence and Epidemiological Features Of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Lithuania. *Veterinary Microbiology* 99, 51-57.

Moennig, V., Houe, H., Lindberg, A., 2005. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Animal Health Research Reviews* 6, 63-74.

Öztürk, D., Kale, M., Pehlivanoglu, F., Hasircioglu, S., Türütoglu, H., 2012. Evaluation for Some Bacterial and Viral Abortions of Dairy Cattle Farms in Burdur District of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18(2), 255-258.

Radositist, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2006. *Veterinary Medicine, A Textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10th edition. Philadelphia, Saunders Ltd, pp. 1248-1277.

Ridpath, J.F., Fulton, R.W., Kirkland, P.D., Neill, J.D., 2010. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine Viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 184-191.

Robert, A., Beaudeau, F., Seegers, H., Joly, A., Philipot, J., 2004. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 61, 117-127.

Rodning, S.P., Marley, M.S., Zhang, Y., Eason, A.B., Nunley, C.L., Walz, P.H., Riddell, K.P., Galik, P.K., Brodersen, B.W., Givens, M.D., 2010. Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* 73(8), 1154-11636.

Şimşek, A., Öztürk, F., 1997. Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persiste bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonlarının araştırılması ve epizootiyolojik önemi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 13(2), 113-119.

Şişman, H., Akkan, H.A., 2008. Muğla İli ve çevresinde sığırcılık işletmelerinde Bovine Viral Diyarre (BVDV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van

Tan, M.T., Karaoğlu, T., Erol, N., Yıldırım, Y., 2006. Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 30, 299-304.

Walz, P.H., Grooms, D.L., Passler, T., Ridpath, J.F., Tremblay, R., Step, D.L., Callan, R.J., Givens, M.D., 2010. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. Journal of Veterinary Internal Medicine 24, 476-486.

Wittum, T.E., Grotelueschen, D.M., Brock, K.V., Kvasnicka, W.G., Floyd, J.G., Kelling, C.L., Odde,

K.G., 2001. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. Preventive Veterinary Medicine 49, 83-94.

Xue, W., Mattick, D., Smith, L., Maxwell, J., 2009. Fetal protection against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine. The Canadian Journal of Veterinary Research 73, 292-297.

Yazıcı, Z., Okur, Gümüsova, S., Albayrak, H., 2007. Serological profile of some viral infections in unvaccinated cattle in Turkey. Medycyna Weterinarna 63(2), 187-189.

Yıldırım, Y., Burgu, İ., 2005. Kuzeydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda mavi dil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 52, 113-117.

Denizli ve Burdur Yöresindeki Sığırlarda Bovine Respiratory Syncytial Virus Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması

Serological Investigation of Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection in Cattle in the Denizli and Burdur District

Arif KARAOTÇU¹ , Yakup YILDIRIM^{1*} 

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Öz: Bu çalışma, Denizli ve Burdur yörelerindeki sığırlarda Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) enfeksiyonunun varlığının serolojik olarak saptanması ve bu yörelerdeki yaygınlığı hakkında bilgi edinilmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada, Ekim 2017- Mart 2018 tarihleri arasında hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı Denizli ilinin Acıpayam, Bozkurt, Çameli, Pamukkale, Serinlisar, Tavas ilçelerinde ve Burdur ilinin Çavdır, Gölhisar, Karamanlı, Tefenni ilçelerinde bulunan küçük aile işletmelerinde yetiştiriciliği yapılan 6 ay yaştan büyük farklı ırk ve cinsiyette toplam 271 adet sığırdan kan serumu örneği alınmıştır. Toplanan serum örneklerinin indirekt ELISA ile analizleri sonucunda BRSV seropozitifliği %76.38 oranında bulunmuştur. İllere göre de BRSV antikor oranı da Denizli’de %68.38, Burdur’da %84.44 olarak tespit edilmiştir. Numunelerin toplandığı illerde tespit edilen seropozitiflik oranları arasındaki farklılığın istatistiki açıdan karşılaştırıldığında önemli olduğu ($P<0.01$) belirlenmiştir. Sonuç olarak, Denizli ve Burdur yörelerinde küçük aile işletmelerinde yetiştirilen sığırlarda BRSV enfeksiyonunun yaygın olarak bulunduğu ve bu enfeksiyonun kontrolü/mücadelesi amacıyla ciddi önlemlerin alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), ELISA, Seroloji, Sığır.

Abstract: This study was carried out in order to detect presence serologically Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) infection in cattle, located around Denizli and Burdur areas and to obtain information about its prevalence in these areas. In the study, between the dates October 2017 and March 2018, blood serum samples were taken from 271 cattle of different breed and gender, age than 6 months in Acıpayam, Bozkurt, Çameli, Pamukkale, Serinlisar and Tavas districts of Denizli where stockbreeding is densely practiced and in small family-owned farm found in Çavdır, Gölhisar, Karamanlı and Tefenni districts of Burdur. As a result of the analysis by indirect ELISA test of the collected serum samples, BRSV seropositivity was found 76.38%. BRSV antibody ratio according to provinces was detected as 68.38% in Denizli and 84.44% in Burdur. When we statistically compared the difference between the seropositivity rates detected in provinces where samples were collected, it was considered as fairly important ($P<0.01$). Consequently, we revealed to the conclusion that BRSV infection has been commonly seen in cattle bred in small family-owned businesses located around Denizli and Burdur areas and serious precautions needed to be taken so as to control/struggle against this infection.

Keywords: Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), ELISA, Serology, Cattle.

*Corresponding author : Yakup YILDIRIM
Geliş tarihi / Received : 14.11.2019

e-mail : yyildirim@mehmetakif.edu.tr
Kabul tarihi / Accepted: 10.12.2019

Giriş

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) dünyada yaygın olarak görülen sığırların önemli solunum sistemi enfeksiyon etkenlerinden birisidir. BRSV *Paramyxoviridae* ailesindeki *Pneumovirinae* alt ailesinin *Pneumovirus* genusunda bulunan RNA’lı ve zarlı bir etkenidir. Bu genusta antijenik ve yapısal olarak birbirlerine benzerlik

gösteren birçok farklı türde enfeksiyon oluşturan respiratory syncytial viruslar yer alır (Evermann ve ark., 1985; Shadomy ve ark., 1997). BRSV, nöyraminidaz ve hemaglütinin aktivitelere sahip olmaması ile *Paramyxoviridae* familyasının diğer üyelerinden farklılık gösterir (Cash ve ark., 1977; Matthews ve ark., 2000). Bu virusun yapısında 5

adedi zarda (tutunma glikoproteini G, füzyon proteinleri F1-F2, matriks proteinleri M1-M2 ve küçük hidrofobik protein SH), 3 adedi nükleokapsit de (büyük nükleokapsit proteini N, fosfoprotein P ve büyük protein L) olmak üzere 8 adet yapısal, iki adet de yapısal olmayan (NS1 ve NS2) toplam 10 adet protein bulunur (Lambert ve Pous, 1983; Olmsted ve Collins, 1989; Smith, 2009).

Virus sağlıklı hayvanlara direkt ve indirekt yolla bulaşmakla birlikte en yaygın olarak aerosol yolla bulaşır (Stott ve Taylor, 1985; Kimman ve ark., 1988; Wellemans, 1990; Elvander, 1996). BRSV enfeksiyonunun prevalans oranları coğrafi konum, iklim ve atmosferik basınç farklılıklarına göre değişiklik gösterir (Mohanty ve ark., 1975; McNulty ve ark., 1983; Kimman ve ark., 1988). Hastalık mevsimle ilişkili olup, düşük atmosferik basıncın hakim olduğu sonbahar-kış aylarında daha fazla görülür (Bryson ve ark., 1982; Edwards ve ark., 1984; Kimman ve ark., 1988). BRSV enfeksiyonunun gelişiminde sürü yönetimi ve barınma koşulları önemli rol oynar. Genç sığırlarla yaşlıların bir arada bulunması, ahır ortamının havasız olması, nakil, sütten kesme ve kalabalığa bağlı stres BRSV enfeksiyonu salgınlarına sebep olabilmektedir (Bryson ve ark., 1978; Pirie ve ark., 1981).

Doğal enfeksiyonlarda aniden ortaya çıkabilen, BRSV enfeksiyonunun inkübasyon periyodu kısa olduğu için duyarlı popülasyonlarda yayılımı çok hızlıdır (Bryson ve ark., 1978; Edwards ve ark., 1984). Hastalık çoğunlukla 3-9 ay yaştaki genç sığırlarda akut tablo oluştururken ileri yaştaki sığırlarda subklinik olarak seyreder (Fulton ve ark., 1982; Elvander, 1996). Farklı hayvan türlerinde benzer klinik semptomlar oluşturan virus, yerleştiği dokuya göre üst ve alt solunum sistemi veya her ikisinin birlikte enfeksiyonuna neden olur. Ateş, iştahsızlık ve gittikçe ilerleyen bir öksürükle başlayan hastalığa nazal ve oküler akıntılar eşlik eder. Solunum sayısındaki belirgin artış, konjunktivitis, abdominal solunum ve baş-boyun bölgesinde ödem ağır vakalarda karşılaşılan bulgulardandır. Enfeksiyonun görüldüğü işletmelerde yemden yararlanma gücünün

azalması, ağırlık kaybı ve erginlerde süt veriminin azalması gibi nedenlerle ekonomik kayıplar oluşur. Ayrıca BRSV'nin hayvan sağlığındaki en önemli risklerinden biriside sekonder bakteriyel (*Mannheimia haemolytica* vs) enfeksiyonlara predispozisyon oluşturmaktadır (Baker ve Frey, 1985; Divers, 2007; Brodersen, 2010).

Hastalığın klinik tanısı oldukça zordur (Wellemans, 1990). Kesin teşhisin serolojik veya virolojik yöntemler kullanılarak yapılması gerekir. Etkenin izolasyonu amacıyla hücre kültürü çalışmalarının çok güç, masraflı ve zaman kaybına sebep olduğu bildirilmiştir. Bunun yerine teşhis için serum nötralizasyon ve ELISA testleri önerilmektedir (Gillette, 1983; Jalowayski ve ark., 1990; Kellogg, 1991; Elvander, 1996; Özkul ve Özsan, 1998). Son yapılan çalışmalarda antikorlarının tespitinde ELISA'nın serum nötralizasyon testinden daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur (Kovarcik, 2001).

Bu çalışmada, Denizli ve Burdur yörelerinde bulunan 6 ay yaştan büyük ve BRSV'ye karşı aşılammış farklı ırk, cinsiyet ve yaşta olan sığırlardan toplanan kan serum örneklerinde BRSV enfeksiyonunun varlığının indirekt ELISA yöntemi ile serolojik olarak belirlenmesi ve söz konusu yörelerdeki yaygınlığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hastalıkla ilgili olarak araştırmanın planlandığı bölgede hiçbir çalışmanın yapılmamış olmasından dolayıda literatür bilgilerine katkı sağlanmasında hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bu araştırmanın yürütülmesi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (MAKÜ-HADYEK, 13.09.2017/317) tarafından uygun görülmüştür.

Örneklenen Hayvanlar

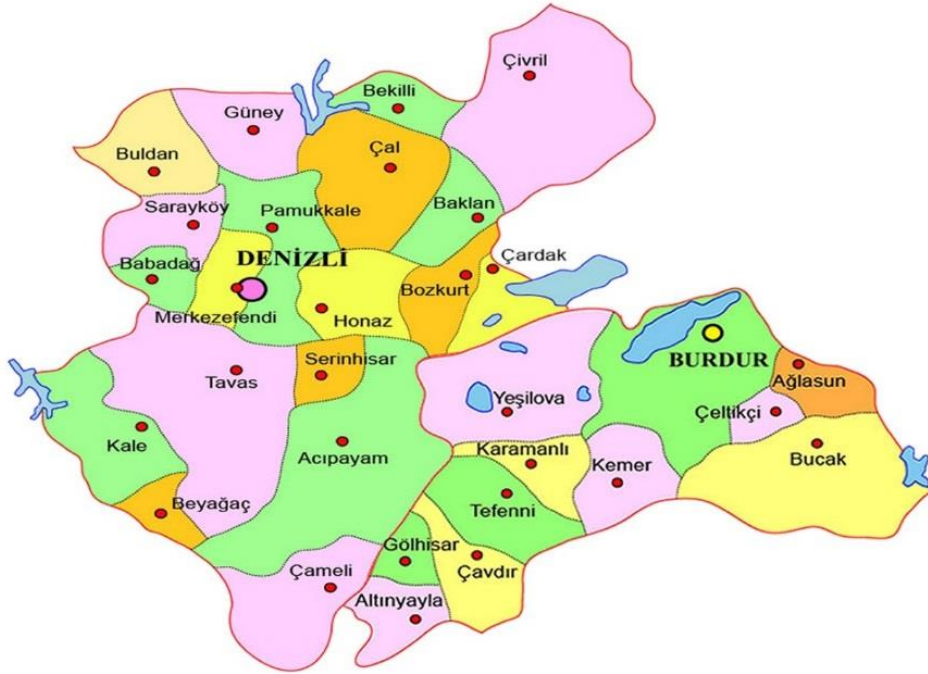
Bu çalışmada, Denizli ve Burdur yörelerinde bulunan 6 ay yaştan büyük farklı ırk, cinsiyet ve yaşta 271 sığırdan koagulanlı tüpler kullanılarak kan örnekleri toplandı (Tablo 1). Örnekleri alınan sığırlardan en küçüğü 6 ay yaşta, en büyüğü ise 13

yaşındaydı. Denizli ilinden 6 adet ilçede (Acıpayam, Bozkurt, Çameli, Pamukkale, Serinhisar, Tavas), Burdur ilinden ise 4 adet ilçede

(Çavdır, Gölhisar, Karamanlı, Tefenni) yetiştirilen sığırlardan örnekleme yapıldı (Şekil 1).

Tablo 1. Toplanan örneklerin illere ve cinsiyetlerine göre dağılımı

İl	Erkek	Dişi	Toplam
Denizli	95	41	136
Burdur	59	76	135
Toplam	154	117	271



Şekil 1. Denizli ve Burdur illerinin siyasi haritası

Çalışmada kullanılacak örnek sayısının belirlenmesinde openepi programı kullanılarak; %99,9 güven seviyesinde, %90 güven aralığı, %10 hata payında 473000 popülasyon büyüklüğüne (Denizli ili sığır sayısı: 263983, Burdur ili sığır sayısı: 208934, 2017 yılı TÜİK verileri) (TÜİK, 2017) sahip sürü de BRSV enfeksiyonunun tahmini prevalansının %50 oranında olması değerlendirilerek örneklem büyüklüğü 271 olarak hesaplanmıştır (Openepi, 2017).

Serum örneklerinin hazırlanması

Kan numuneleri V. jugularis'ten steril olarak koagulanlı tüplere alınıp 4°C de muhafaza edilerek laboratuara getirildi. Laboratuara getirilen kan numuneleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan serum kısımları stok tüplere konularak test aşamasına kadar -20°C de saklandı.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Serum örneklerinde, indirek ELISA yöntemi kullanılarak bovine respiratory syncytial virusa spesifik antikorların varlığı araştırıldı. Bu amaçla BioX Diagnostics firmasının ürettiği monoscreen Ab ELISA BRSV (BIO K 061/5 Rochefort-Belçika) kiti kullanıldı. Bu test kiti BRS virusunun F (füzyon) proteinine spesifik monoklonal antikorlarla duyarlılaştırılmış biçimde hazırlanmıştır. Test, üretici firmanın belirttiği

prosedüre göre yapıldı ve sonuçlar spektrofotometrik olarak (fotometrede 450 nm, ELISA okuyucu, Mindray MR-96A, Hamburg-Almanya) pleytlerin her bir kuyucuğunun optik dansitesi (OD) ölçülerek kantitatif değerler elde edildi ve kitin protokolünde bildirildiği şekilde hesaplamalar yapıldı.

Test prosedürüne göre aşağıdaki tablo kullanılarak, her bir serumun pozitiflik derecesi belirlendi ve bir artı (+) değerinden büyük veya ona eşit olan her bir sonuca sahip örnek pozitif kabul edildi.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val ≤	%20	< Val ≤	%40	< Val ≤	%60	< Val ≤	%80	< Val ≤	%100	< Val

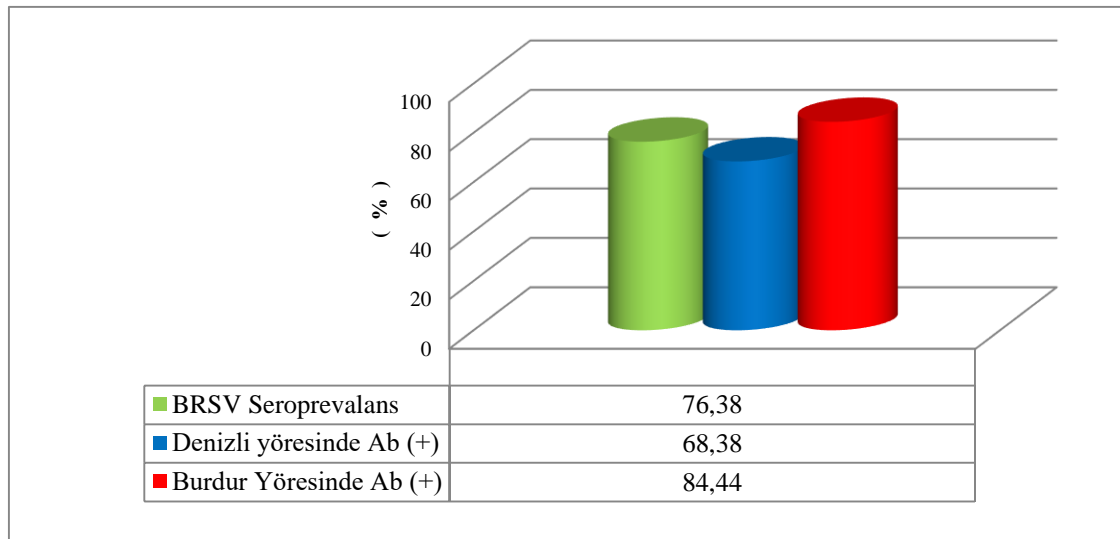
İstatistik Değerlendirme

İstatistik değerlendirme, Minitab 16 Statistical Software yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İller arasında, farklı ırk hayvanlarda ve değişik yaş gruplarında tespit edilen seropozitif değerler arasındaki çeşitliliğin kendi içlerinde önemli olup olmadığını belirlemek için Ki-Kare (chi-square - χ^2) testi kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı.

Araştırmada $P < 0,05$ değeri elde edilen veriler anlamlı (önemli) olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışma kapsamında toplanan 271 sığır kan serumunda, BRSV enfeksiyonunun seroprevalansı %76.38 oranında tespit edildi. İller bazında Denizli yöresinde %68.38, Burdur yöresinde ise %84.44 oranında seropozitiflik belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Denizli ve Burdur yörelerinde seropozitiflik oranları

Tablo 2. Denizli ve Burdur yörelerinde BRSV Antikor (Ab) oranları.

İl	Toplam	BRSV Ab		BRSV Ab	
		(+)	%	(-)	%
Denizli	136	93	68.38	43	31.62
Burdur	135	114	84.44	21	15.56
Toplam	271	207	76.38	64	23.62

Çalışmanın bir bölümünü oluşturan Denizli yöresinde ilçe bazında en yüksek seropozitiflik (%81.39) Acıpayam ilçesinde tespit edildi. Denizli ilinin diğer ilçelerinden Bozkurt'ta %54.16, Çameli'de %44.44, Pamukkale'de %65.38, Serinhisar'da %80.95 ve Tavas'ta ise %53.84 oranında seropozitiflik saptandı.

Yine araştırmanın diğer bölümünü oluşturan Burdur yöresinde de en yüksek (%96.29) seropozitifliğe Gölhisar ilçesinde rastlandı. Örneklemenin yapıldığı diğer ilçelerden Çavdır'da %85.36, Karamanlı'da %66.66 ve Tefenni'de ise %81.03 seropozitiflik belirlendi.

Araştırmamızda tespit ettiğimiz seropozitifliğin cinsiyetlere göre dağılımına baktığımızda erkeklerde %68.83, dişilerde ise %86.32 oranında olduğu görülmüştür.

Numune alınan sığır ırkları Holstein, Simental, Montofon ve Angus da BRSV seropozitifliği

sırasıyla %75.46, %85.19, %85.19, %80.95 oranında belirlendi. İl bazında değerlendirildiğinde Denizli yöresindeki sığır ırklarında bu seropozitiflik oranları Angus ırkında %78.94, Holstein'de %66.33, Simental' de %72.72, Montofon'da ise %60 olarak bulundu. Aynı şekilde Burdur yöresinde ırklara göre seropozitifliğin dağılımı; Angus ırkında %100, Holstein'de %83.48, Simental'de %93.75 ve Montofon'da da %50 oranında belirlendi.

Araştırmada, örnekleme yapılan hayvanların yaşlarına göre BRSV seropozitiflik oranları belirlenmiştir. Buna göre 6 ay-1 yaş grubundaki hayvanlarda %68.12, 2-3 yaş grubundaki hayvanlarda %72.52, 4-5 yaş grubundaki hayvanlarda %93.62, 6-7 yaş grubundaki hayvanlarda %76.92, 8-9 yaş grubundaki hayvanlarda %100, 10 yaş ve üzeri grubundaki hayvanlarda da %100 oranında antikor pozitiflik tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Yaş gruplarına göre BRSV seropozitiflik oranları

Yaş	Örneklenen Hayvan Sayısı	BRSV Ab		BRSV Ab	
		Pozitif sayısı	%	Negatif sayısı	%
6 ay-1 yaş	69	47	68.12	22	31.88
2-3 yaş	131	95	72.52	36	27.48
4-5 yaş	47	44	93.62	3	6.38
6-7 yaş	13	10	76.92	3	23.08
8-9 yaş	5	5	100	0	0
10 yaş ve üzeri	6	6	100	0	0
Toplam	271	207	76.38	64	23.62

İstatistik Değerlendirme Sonuçları

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, Denizli ve Burdur da tespit edilen BRSV seropozitiflik oranları arasındaki farklılık, istatistiki açıdan önemli olarak ($P < 0,01$) tespit edildi ($\chi^2=9.689$, $P=0.002$). Buna karşın 4 farklı sığır ırkında tespit edilen seropozitiflik değerleri arasındaki farklılığın, istatistiki açıdan karşılaştırıldığında ise önemsiz olduğu ($P > 0,05$) belirlendi ($\chi^2=2.941$, $P=0.401$). Yine farklı yaş gruplarında belirlenen seropozitiflik değerleri arasındaki farklılığın da istatistiki açıdan anlamsız olduğu ($P > 0,05$) saptandı ($\chi^2=14.840$, $P=0.011$).

Tartışma

Sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerin başarılı olabilmesi için iyi bakım ve besleme sağlamanın yanı sıra hayvan sağlığının da korunması gereklidir. Bu bağlamda solunum sistemi hastalıkları sığır sağlığını etkileyen en önemli hastalıkların başında gelmektedir. Solunum yolu enfeksiyonları bir veya birden çok patojen etkenin birlikte sinerjik etki gösterdiği kompleks hastalık tablosu şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Solunum sistemine yerleşen ve enfeksiyon oluşturan etkenlerin içerisinde yer alan bovine respiratory syncytial virus da tek başına veya diğer viral ve bakteriyel etkenlerle birlikte sığır sağlığını tehdit etmektedir. BRSV'nin patojenitesine yaş, bakım-besleme ve immün yetmezlik faktörlerinin yanı sıra stres, çevre ve aynı anda meydana gelen sekonder viral ve bakteriyel enfeksiyonlarında katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Castleman ve ark., 1985; Brandenburg ve ark., 2001).

RSV enfeksiyonu tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sığır, keçi ve koyun popülasyonlarında yaygın olarak görülmekte ve geçimini hayvan yetiştiriciliği yaparak sağlayan yörelerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. İlk serolojik verileri 1968 yılında Doggett ve ark. tarafından ortaya konulan BRSV enfeksiyonu ile ilgili olarak takip eden yıllarda virusun yapısı, replikasyon siklusu ve patogenezi ile ilişkili oldukça fazla çalışma yapılmıştır (Morgen ve ark., 1985; Stewart ve Gershwin, 1989). Bu araştırmalar sonucunda hastalığın dünyanın pek

çok yerinde yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca etkenin birçok türde patojenite gösterdiği ve ciddi enfeksiyon bulguları oluşturduğu tespit edilmiştir (Fulton ve ark., 1982; Brako ve ark., 1984; Baker ve ark., 1985; Valarcher ve Taylor, 2007).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) Rossi ve Kiesel (1974), mikronötralizasyon testini kullanarak yaptıkları serolojik araştırmada %67 oranında yetişkin sığırlarda BRSV antikor tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada sürü bazında solunum sistemi enfeksiyonu şekillenen üç sürüde BRSV serokonversiyon oranının %100 olduğu görülmüştür. Yine ABD de yapılan başka bir çalışmada, nötralizasyon testi uygulanan 559 adet sığır kan serumunda %65.5 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Baker ve ark., 1985). Pernthaler ve ark. (1990) da 1376 adet kan serumu örneğinde respiratorik viral patojenlere karşı oluşmuş spesifik antikor yanıtı tespit etmeye çalışmışlar ve kan serumu örneklerinin %17.4'ün de BRSV seropozitifliği belirlemişlerdir. Motha ve Hansen (1997) Yeni Zelanda'da 14736 küçük süt sığır işletmesinden rastgele seçtikleri 272 işletmede indirekt ELISA yöntemini kullanarak yaptıkları serolojik taramada, sürüler arasında BRSV enfeksiyonunun seroprevalansını %76.47 oranında bulmuşlardır. Bir ada ülkesi olan Yeni Zelanda'da endemik olarak görülen BRSV'nin, sürülerde görülen solunum sistemi problemlerinde önemli bir etiyolojik ajan olduğu düşünülmüştür. Klem ve ark. (2013) Norveç'te 134 süt sığır sürüsünü altı ay arayla BRSV yönünden aldıkları kan serumlarına uyguladıkları indirekt ELISA yöntemiyle taramışlar ve birinci örneklemede sürülerin %34'de, ikinci örneklemede ise % 41'inde seropozitiflik tespit etmişler. Aynı çalışmada hastalığın yaz ve kış aylarında görüldüğü fakat sürülerde kış aylarında şekillenen BRSV enfeksiyonunun popülasyonda daha çok hayvanı etkilediğini bildirilmiştir. Yine Klem ve ark. (2014) Norveç'te sığır sürülerinde görülen solunum sistemi hastalıklarında BRSV'nin etiyolojik rolünü araştırmışlar ve sığırlarda görülen 21 solunum sistemi enfeksiyonu salgınının 18'inde (%86) tek başına BRS virusu serolojik veya virolojik olarak saptamışlardır.

Kresic ve ark. (2018) 2011-2016 yılları arasında Hırvatistan'da görülen BRSV suşlarının genetik çeşitliliğini araştırmışlar ve bunların üç farklı genetik alt grup içerisinde yer aldığını belirlemişlerdir. Çalışmada, BRSV'nin immun sistemden kaçışı için viral mekanizmada sürekli evrimin şekillendiği temel bir immunodominant bölge içinde özgün mutasyonların şekillendiği tespit edilmiştir.

Hoppe ve ark. (2018) yılda yaklaşık 44.6 milyon buzağının üretildiği Brezilya'da 26 çiftlikten topladıkları 1243 kan serumu örneğinde BRSV antikorlarının varlığını belirlemek için virus nötralizasyon testini kullanarak %79.5 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir. Numunelerin alındığı 26 çiftlikte BRSV seroprevalansının %40 ile %100 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ferella ve ark. (2018) da Arjantin'de BRSV'nin seroprevalansını %78.64 oranında bildirmişlerdir. Sürülerde tespit edilen yüksek pozitifliği de; hayvanın yaşı, solunum sistemi hastalığı klinik bulgularının mevcudiyeti ve sürü büyüklüğü gibi faktörlerin etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Türkiye'de BRSV enfeksiyonunun serolojik verileriyle alakalı ilk araştırma Burgu ve ark. (1990) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada küçük aile işletmelerinde ve kamu işletmelerinde yetiştirilen 490 sığırdan aldıkları kan serumu örneklerinde serum nötralizasyon testi ile %46.12 oranında BRSV'ye spesifik nötralizan antikorlar pozitifliği saptamışlardır. Alkan ve ark. (1997) ise kamuya ait 10 işletmeden topladıkları 480 sığır kan serumunda %44.6 oranında BRSV seropozitifliği bildirmişlerdir. Çabalar ve Can Şahna (2000) da Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan kamuya ait (5 adet) ve özel işletmelerde (12 adet) yetiştirilen süt sığırlarından aldıkları 471 kan serum örneğinde BRSV seropozitifliğini %67.3 olarak saptamışlardır. Bu işletmelerin %88.2'sinde (15 işletmede) seropozitif hayvanın bulunduğunu tespit etmişlerdir. Yavru ve ark.'nın (2005) yaptıkları araştırmada ise BRSV seropozitifliği %46.06 oranında bildirilmiştir. Yeşilbağ ve Güngör (2008) de Marmara Bölgesinde bulunan 7 ilden topladıkları sığır kan

serumlarında BRSV antikor pozitifliğini %73.0 oranında belirlemişlerdir. Güdek (2016) ise Aydın ili ve çevresinde yetiştirilen süt sığırlarında BRSV seropozitifliğini %98.6 olarak bildirmiştir. Ayrıca bu antikor pozitifliğin işletmeler bazında %97.1 ile %100 arasında değiştiğini belirlemiştir. Öner ve Yeşilbağ (2018) da yaptıkları çalışmada 6-15 aylık besi hayvanlarında BRSV spesifik antikor pozitifliğini %97.1 oranında bulmuşlardır.

Bizim araştırmamızda ise, BRSV enfeksiyonunun seroprevalansı %76.38 oranında tespit edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı illere göre de bu seropozitiflik oranları Denizli de %68.38, Burdur da ise %84.44 olarak belirlenmiştir. İlçelere göre ise seropozitiflik oranlarının dağılımı Denizli ilinin ilçelerinde %44.44 ile %81.39 oranları arasında, Burdur ilinin ilçelerinde ise %66.66 ile %96.29 oranları arasında saptanmıştır. Bu sonuçlar Türkiye de daha önce yapılan başka araştırmalarda bildirilen verilerle paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz seropozitiflik oranının daha öncekilerle benzerlik göstermesi oldukça değerli bir veridir. Ülkemizde bölgeler arasında devamlı bir hayvan sirkülasyonunun olması, patojen enfeksiyon etkenlerinin yayılmasında önemli bir faktördür. Buda farklı bölgelerde, bazı enfeksiyonların benzer oranlarda oluşmasının sebeplerinden birisi olarak değerlendirilebilir.

Araştırmamızda il, ırk ve yaşa göre tespit edilen BRSV seropozitif oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Burdur ve Denizli illerinde tespit edilen farklı oranlarındaki antikor pozitifliğin istatistiksel olarak önemli ($P<0.01$) olduğu belirlendi. Ancak sığır ırklarında tespit edilen seropozitif oranları arasındaki farklılık ile yaş gruplarında belirlenen değişik antikor pozitif oranları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) oldukları ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda, numune alınan hayvanlara söz konusu enfeksiyona karşı aşılama yapılmadığı ve araştırmada maternal antikorların seroprevalansı etkileyebilme ihtimalini ortadan kaldırmak için 6 ay yaştan büyük hayvanlardan örnekleme yapılmış

olmasından dolayı, tespit edilen serolojik verilerin doğal enfeksiyona bağlı olduğunu göstermektedir.

Bu kadar yaygın görülen BRSV enfeksiyonu ile mücadele oldukça önemlidir. Hastalıklara bağlı ekonomik kayıpların en aza indirgenmesi için hayvanları BRSV ve diğer patojen etkenlerden koruma ve mücadele programlarının uygulanması, tedavi masraflarının azaltılması başlıca hedef olmalıdır. Bu programları uygularken güncel aşı suşlarından hazırlanmış aşuların kullanımı oldukça önemlidir.

Viral hastalıklardan koruma amacıyla uygulanan aşılarda asıl hedef bireyselden ziyade sürü direncinin artırılmasıdır. Bu sayede sürüdeki dirençli hayvanların mevcudiyeti, duyarlı bireylerin enfeksiyon etkenleriyle temas ihtimalini en aza indirecek ve sürü halinde enfeksiyona direnci arttıracaktır. Solunum sistemi hastalıklarının multi-faktöriyel etiyojisi ve hayvanların bu etmenlere kısa zaman içerisinde maruz kalmaları koruma ve tedavide güçlükler çıkarmaktadır. Bu bakımdan viral kaynaklı hastalıklardan korumada, aşı uygulaması en önemli seçenek olarak değerlendirilmeli ve polivalan aşular korumada kullanılmalıdır.

BRSV'nin etkinliğini ve prevalansını azaltmak için etkili sürveyans stratejisi uygulamak ve negatif sürülerde yüksek biyogüvenlik tedbirleri almak faydalı olacaktır. Enfeksiyondan korunmada maternal antikorların önemi unutulmamalı ancak maternal antikor almış iki aylıktan küçük buzağuları BRSV hastalığından korumak için uygulanan aşuların maternal antikor varlığında çalışmadıkları (Larsen ve ark., 2001) hatırdan çıkarılmamalıdır.

Sonuç olarak, BRSV enfeksiyonunun çalışmanın yapıldığı yörelerde oldukça yaygın oranda varlığının ortaya konulduğu bu araştırmanın verileri dikkate alındığında, söz konusu hastalığın hem Denizli-Burdur bölgesinde hemde Türkiye'nin diğer bölgelerinde hayvan yetiştiriciliği bakımından önemli olduğu ve enfeksiyonun önlenmesi amacı ile ciddi tedbirlerin alınması gerektiği görülmektedir. Özellikle organize hayvan yetiştiriciliği yapılmayan küçük ölçekli aile

işletmelerinde bu konular daha fazla önem taşımaktadır.

Teşekkür

İlk yazarın aynı adlı yüksek lisans tezinden özetlenen bu araştırma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0471-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Alkan, F., Özkul, A., Karaoğlu, T., Bilge, S., Akça, Y., Burgu, İ., Oğuzoğlu, Ç., Yeşilbağ, K., 1997. Sığırlarda Viral Nedenli Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. Ankara Üniversitesine Veteriner Fakültesi Dergisi 44(1), 73-80.

Baker, J.C., Frey, M.L., 1985. Bovine respiratory syncytial virus. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 1, 259-275.

Baker, J.C., Ames, T.R., Markham, R.J.F., 1985. Serologic studies of BRSV in Minnesota cattle. American Journal of Veterinary Research 46(4), 891-892.

Brako, E.E., Fulton, R.W., Nicholson, S.S., Amborski, G.F., 1984. Prevalance of bovine herpesvirus-1, BVD, PI-3, goat respiratory syncytial, bovine leukemia, and bluetongue viral antibodies in sheep. American Journal of Veterinary Research 45(4), 813-816.

Brandenburg, A.H., Neijens, H.J., Osterhaus, A.D.M.E., 2001. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: Implications for vaccine development. Vaccine 19, 2769-2782.

Brodersen, B.W., 2010. Bovine respiratory syncytial virus. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice 26(2), 323-333.

Bryson, D.G., McFerran, J.B., Ball, H.J., Neill, S.D., 1978. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. Epidemiological and clinical findings. Veterinary Record 103, 485-489.

Bryson, D.G., McNulty, M.S., Logan, E.F., Cush, P.F., 1982. Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: Clinical and pathologic findings. American Journal of Veterinary Research 44(9), 1648-1655.

Burgu, İ., Toker, A., Akça, Y., Alkan, F., 1990. A seroepidemiologic study of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr 97, 88-89.

Cash, P., Wunner, W.H., Pringle, C.R., 1977. A comparison of the polypeptides of human and bovine Respiratory Syncytial viruses and murine pneumonia virus. *Virology* 82, 369-379.

Castleman, W.L., Torres-Medina, A., Hawkins, K.L., Dubovi, E.J., Atz, J.M., 1985. Severe respiratory disease in dairy cattle in New York state associated with bovine respiratory syncytial virus infection. *Cornell Veterinary* 75, 473-483.

Çabalar, M., Can Şahna, K., 2000. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Süt Sığırlarında Parainfluenza Virus-3, Bovine Herpes Virus-1 ve Respiratory Syncytial Virus Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi, *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi* 11(2), 101-105.

Divers, T.J., 2007. Respiratory diseases In: Divers, T.J., Peek, S., (Eds). *Rebhun's diseases of dairy cattle*. Elsevier Health Sciences. pp. 79-105.

Doggett JE, Taylor-Robinson D, Gallop RGC. (1968). A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus. *Archiv für die gesamte Virus for schung* 23(1-2), 126-37.

Edwards, S., Newman, R.H., Stanley, M., 1984. Respiratory Syncytial Virus Diagnosis. *Veterinary Record* 114(4), 101.

Elvander, M., 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus, *Veterinary Record* 138, 101-105.

Evermann, J.F., Liggitt, H.D., Parish, S.M., Ward, A.C., Lea Master, B.R., 1985. Properties of a respiratory syncytial virus isolated from a sheep with rhinitis. *American Journal of Veterinary Research* 45(8), 1641-1643.

Ferella, A., Aguirreburualde, M.S.P., Margineda, C., Aznar, N., Sammarruco, A., Santos, M.J.D., Mozgovoij, M., 2018. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in feedlot cattle from Córdoba and Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 50(3), 275-279.

Fulton, R.W., Downing, M.M., Hagstad, H.V., 1982. Prevalance of bovine herpesvirus-1, BVD, PI-3, bovine adenoviruses-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. *American Journal of Veterinary Research* 43 (8), 1454-1457.

Gillette, K.G., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for serum to bovine respiratory syncytial virus: Comparison with complement-fixation and neutralization tests. *American Journal of Veterinary Research* 44(12), 2251-2255.

Güdek, M., 2016. Aydın İli ve çevresindeki süt siğirciliği işletmelerinde bovine respiratory syncytial virus (BRSV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Hoppe, I.B.A.L., Ramos de Medeiros, A.S., Arns, C.W., Samara, S.I., 2018. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in nonvaccinated dairy cattle herds in Brazil. *BMC Veterinary Research* 14, 208.

Jalowayski, A.A., Walpita, P., Puryear, A.A., Connor, J.D., 1990. Rapid detection of Respiratory Syncytial virus in nasopharyngeal specimens obtained with the rhinoprobe scraper. *Journal of Clinical Microbiology* 28(4), 738-741.

Kellogg, A., 1991. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 115, 451-456.

Kimman, T.G., Zimmer, G.M., Westenbrink, F., VanLeeuwen, E.M.J., 1988. Epidemiological Study of BRSV Infection in calves: Influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Veterinary Record* 123, 104-109.

Klem, T.B., Gulliksen, S.M., Lie, K.I., Loken, T., Østerås, O., Stokstad, M., 2013. Bovine respiratory syncytial virus: infection dynamics within and between herds. *Veterinary Record* 16, 1-6.

Klem, T.B., Rimstad, E., Stokstad, M., 2014. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. *BMC Veterinary Research* 10, 15.

Kovarcik, K., 2001. The development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in blood serum. *Veterinary Medicine- Czech* 46 (2), 29-34.

Kresic, N., Bedekovica, T., Brnica, D., Simica, I., Lojkica, I., Turk, N., 2018. Genetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in Croatia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 58, 52-57.

Lambert, D.M., Pous, M.W., 1983. Respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* 130(1), 204-214.

Larsen, L.E., Tegtmeier, C., Pedersen, E., 2001. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42(1), 113-121.

Matthews, J.M., Young, T.F., Tucker, S.P., Mackay, J.P., 2000. The core oh the Respiratory

Syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. Journal of Virology 74(13), 5911-5920.

McNulty, M.S., Bryson, D.G., Allan, G.M., 1983. Experimental Respiratory Syncytial Virus pneumonia in young calves: Microbiologic and immunofluorescent findings. American Journal of Veterinary Research 44(9), 1656-1659.

Mohanty, S.B., Ingling, A.L., Lillie, M.G., 1975. Experimentally induced Respiratory Syncytial virus infection in calves. American Journal of Veterinary Research 36(4), 417-419.

Morgen, K.L., Kyle, R.A.M., Martin, H.T., Duncan, A.L., 1985. Serum antibody to respiratory syncytial virus in goats in the UK. Veterinary Record 2, 239-240.

Motha, J., Hansen, M., 1997. Serological survey for bovine respiratory syncytial virus in New Zealand. Surveillance 24(4), 28.

Olmsted, R.A., Collins, P.L., 1989. The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. Journal of Virology 63, 2019-2029.

OpenEpi Version 3.01, 2017. Örneklem sayısı hesaplama.
https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
(Erişim 16.10.2017).

Öner, E.B., Yeşilbağ, K., 2018. Besi sığırlarında solunum sistemi virüslerinin seroprevalansı ve persiste BVD virüs enfeksiyonu tespiti. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 65, 1-7.

Özkuş, A., Özsan, M., 1998. Hücre Kültürlerinde Respiratory Syncytial virus enfeksiyonunun direkt immunoperoksidaz tekniği ile hızlı tanısı. Flora, 3(4), 258-262.

Pernthaler, A., Baumgartner, W., Cerny Reitenet, S., Köfer, J., 1990. Sero epidemiologische Untersuchungen auf erregerspezifischer erkrankungen beim rind. Dtsch Tierarztl Wochenschr 97 (6), 217-264.

Pirie, H.M., Petrie, L., Pringle, C.R., Allan, E.M., Kennedy, G.J., 1981. Acute fatal pneumonia in calves

due to respiratory syncytial virus. Veterinary Record 108, 411-416.

Rossi, C.R., Kiesel, G.K., 1974. Serological Evidence for the Association of Bovine Respiratory Syncytial Virus with Respiratory Tract Disease in Alabama Cattle. Infection and Immunity 10(2), 293-298.

Shadomy, S.V., Baker, J.C., Mufson, M.A., Velicer, L.I., 1997. Phosphoprotein profile analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates. American Journal of Veterinary Research 58(5), 478-481.

Smith, R.A., 2009. North American cattle marketing and bovine respiratory disease (BRD). Animal Health Research Reviews 10(2), 105-8.

Stewart, R.S., Gershwin, L.J., 1989. Detection of IgE antibodies to Bovine Respiratory Syncytial virus. Veterinary Immunology and Immunopathology 20, 313-323.

Stott, A.J., Taylor, G., 1985. Respiratory Syncytial Virus. Brief Review. Archives Virology 84, 1-52.

TUİK 2017. İllere göre sığır sayıları.
<https://biruni.tuik.gov.tr> (Erişim 16.10.2017).

Valarcher, J.F., Taylor, G., 2007. Bovine respiratory syncytial virus infection. Veterinary Research 38(2), 153-180.

Wellemans, G., 1990. Bovine Respiratory Syncytial Virus. In: Dinter, Z., Morein, B., (Eds.), Virus Infections of Ruminants. Elsevier Science, pp. 377-378.

Yavru, S., Şimsek, A., Yapkiç, O., Kale, M., 2005. Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. Acta Veterinaria (Beograd) 55(2-3), 219-226.

Yeşilbağ, K., Güngör, B., 2008. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. Tropical Animal Health Production 40(1), 55-60.

Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Rosa canina Extract and Its Anti-cancer and Anti-metastatic Activity on Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT29

Rosa canina Özütü Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi ve İnsan Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı HT29 Üzerindeki Anti-kanser ve Anti-metastatik Aktivitesi

Çiğdem AYDIN ACAR^{1*} , Suray PEHLİVANOĞLU² 

¹ Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Bucak School of Health, Burdur, Turkey

² Necmettin Erbakan University, Department of Molecular Biology and Genetics, Konya, Turkey

Abstract: Despite progress in conventional treatment methods for colon cancer, it remains the fourth leading cause of cancer-related deaths in the world. Therefore, more effective new treatment strategies for colon cancer are needed. Silver nanoparticles (AgNPs) synthesized using plant extracts have shown therapeutic applications and make it to be a good anti-cancer candidates. The aim of this study was to evaluate the anti-metastatic and anti-cancer activity of biosynthesized silver nanoparticles from *Rosa canina* extract on the human colon adenocarcinoma cell line HT29. The biosynthesis of AgNPs was carried out using *Rosa canina* extract. R-AgNPs were characterized by techniques such as UV-vis spectrophotometer and scanning electron microscopy (SEM). HT29 cells were incubated with different concentrations of AgNPs (0-20 µg/mL) for 48 h. The cytotoxic activity of the synthesized R-AgNPs against human colon adenocarcinoma cells HT29 was investigated by MTT assay and the IC₅₀ value were found to be 7,89 µg/mL at 48 h incubation. Anti-metastatic potential of R-AgNPs were determined on HT29 cells using scratch assay. R-AgNPs induced a significant decrease of cell motility in dose-dependent manner. In conclusion, these findings suggest that the biosynthesized AgNPs may be promising new therapeutic agents for the treatment of human colon cancer.

Keywords: Silver nanoparticles, Colon cancer, Metastasis, AgNPs.

Öz: Kolon kanseri, geleneksel tedavi yöntemlerinde kaydedilen ilerlemelere rağmen, dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Bu nedenle, kolon kanserinin tedavisi için daha etkili yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki özleri kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), terapötik uygulamalar göstermiş ve bu durum onları iyi bir kanser önleyici ajan adayı haline getirmiştir. Bu çalışmada, kuşburnu özütü ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin insan kolon adenokarsinoma hücre hattı HT29 üzerindeki anti-metastatik ve anti-kanser aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezi, kuşburnu bitkisinin sulu özütü kullanılarak gerçekleştirildi. R-AgNP'ler, UV-görünür spektrofotometre ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi çeşitli analitik tekniklerle karakterize edildi. HT29 hücreleri 48 saat süresince çeşitli konsantrasyonlarda R-AgNP'lerle (0-20 µg/mL) muamele edildi. Sentezlenen R-AgNP'lerin insan kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi MTT assay ile değerlendirildi ve IC₅₀ değerinin 48 saatlik inkübasyon sonucunda 7,89 µg/mL olduğu belirlendi. R-AgNP'lerin anti-metastatik potansiyeli, HT29 hücreleri üzerinde scratch assay kullanılarak çalışıldı. R-AgNP'lerin doza bağımlı olarak hücre hareketliliğinde önemli bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Sonuç olarak, bu bulgular biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerin insan kolon kanseri tedavisi için umut verici yeni terapötik ajanlar olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanopartiküller, Kolon kanseri, Metastaz, AgNP.

*Corresponding author : Çiğdem AYDIN ACAR
Geliş tarihi / Received : 29.11.2019

e-mail : cacar@mehmetakif.edu.tr
Kabul tarihi / Accepted: 12.12.2019

Introduction

Colorectal cancer, also known as colon cancer, is a type of cancer that begins in the colon.

cancer is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. In 2018, it was diagnosed in

over one million people and caused death to 880,792 persons worldwide (Bray et al., 2018). Colon cancer risk factors include a person's lifestyle, diet, age, ethnicity and family history (Slattery, 2000). Although some types of cancer are preventable, this is not the case for colon cancer because colon cancer is often detected in advanced stages and is usually not diagnosed until symptoms appear. There are a variety of traditional treatment options such as surgery, radiotherapy and chemotherapy for treating this cancer, but the success rates is very low in advanced stage colon cancer. Because of all these reasons new treatment models in the treatment of colon cancer patients are needed.

Nanotechnology is a rapidly growing area with the advances in science and technology that, aims to produce new materials on the nanoscale (Albrecht et al., 2006). In past decades, metal nanoparticles have been used frequently as new anti-cancer agents owing to their features like cytotoxicity, functionality and compatibility. Especially, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted the attention of researchers due to their various industrial applications (Yesilot and Aydin, 2019). AgNPs can be synthesized using physical, chemical and biological methods. The chemical synthesis is a commonly used approach for the synthesis of AgNPs that use toxic chemicals, leading to non-eco-friendly biological products. In the recent years, green synthesis is preferred due to it is cost effective, environment friendly and easily synthesize large quantities properties compared to other methods (Thakkar et al., 2010). For the green synthesis of nanoparticles, plants extracts, bacteria, fungi, algae, yeast and viruses, which are naturally available resources can be used (Ahmed et al., 2016; Raveendran et al., 2003; Daphne et al., 2018). Plant-mediated synthesis is seen as the most suitable method among green synthesis methods because it allows the formation of more stable nanoparticles in a short time (Iravani, 2011).

Rosehip (*Rosa canina*) is a species of plant belonging to the Rosa genus in the Rosaceae family. Rose hip are widely distributed in several

areas, including Europe, Africa, Middle and West Asia and Anatolia. In recent years, rosehip has been consumed in many cultures as a food and has been used frequently for the treatment of some diseases and has attracted more attention due to its documented therapeutical properties (Chrubasik et al., 2007). Rose hip contains high concentrations of ascorbic acid, phenolic compounds and healthy fatty acids (Larsen et al., 2003). It is a medicinal plant commonly used in traditional medicine for the treatment of colds, asthma, hemorrhoids, infections, chronic pains, arthritis, and inflammatory diseases. Also, rose hip is known to have many biological properties such as diuretic, anti-oxidant, anti-ulcerogenic, anti-obesity, anti-diabetic, anti-carcinogenic, neuroprotective, and anti-microbial effects (Mármol et al., 2017; Cheng et al., 2016; Turan et al., 2017). Thus, in this study, we investigated the synthesis of AgNPs using an aqueous extract of the rose hip and evaluated their anti-cancer and anti-metastatic activities on human colon cancer cells.

Materials and Methods

Preparation of aqueous extract of Rose hip fruit (Rosa canina)

The dried fruit of Rosehip was finely powdered. For preparation of extract, 20 g of rosehip was boiled in 50 mL deionized water for 2 min. The aqueous extract was subsequently filtered through whatman no. 1 filter paper and then was stored at 4°C until further use.

Biosynthesis of silver nanoparticles

For the synthesis of silver nanoparticles (R-AgNPs), 5mL of rosehip extract was mixed with 95 mL of AgNO₃ (5mM). The reaction mixture was incubated at microwave oven (1200W, 50Hz) for 1 min. The progress of the reaction was routinely monitored by observing colour change from yellow to brown, which indicated the formation of R-AgNPs.

Characterization of silver nanoparticles

A combination of analytical techniques was utilized to characterize the synthesized R-AgNPs including UV-vis Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX). UV-Vis spectrophotometer (T60, PG Instruments) was used to confirm the reduction of metal ions and was scanned in the range of 300–700 nm.

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell Line HT29 obtained from Animal Cell Culture Collection (HUKUK, Sap Institute, Ankara, Turkey) were cultured DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), supplemented with 10% heat inactivated Fetal Bovine serum (FBS), L-glutamine, 100µg/mL Penicillin and 100µg/mL Streptomycin and were incubated at 37°C with 5% CO₂ in humidified atmosphere.

Cell viability assay

The cytotoxicity effect of the synthesized R-AgNPs on HT29 cancer cells was evaluated by MTT assay. The cells were grown in DMEM medium containing 10% FBS. For experiments, the cells (1x10⁵ cells/well) were plated in 96-well plates with the medium containing 10% FBS and incubated for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C in humidified atmosphere. Later, the medium was replaced with DMEM containing 1% FBS and the R-AgNPs (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 and 0.075 µg/mL). Cells without nanoparticles were used as a control. After treatment, the plates were incubated for 48 h and 10 µL of MTT prepared at a concentration of 5 mg/mL was added to each well and incubated for 4 h. Purple colour formazan crystals formed were then dissolved in 100 µL of dimethylsulphoxide (DMSO). Viability of the cells was evaluated by measuring the absorbance at 570 nm in a multiwell ELISA plate reader (Multiscan GO, Thermo Fisher Sci.). The absorbance at 570 nm was also measured for wells without any sample as blank. The % cell viability was evaluated using the

following equation:

Cell viability (%): (the OD of treated well/the OD of control well) X100

IC50 value was calculated from the dose-response curve obtained with this assay.

Scratch Assay

Cell migration was determined by using an *in vitro* scratch assay. HT29 cells were seeded in 24 well culture plates and grown to 100% confluence. A scratch was made in the monolayer of cells with a sterile pipette tip. Measures were taken to maintain the same scratch angle in the test and control wells. After a scratch was made, the cells were washed with PBS to remove unattached cells. At 10X magnification of an inverted microscope equipped with a camera, images of control and test wells (0,1µg/mL and 1µg/mL R-AgNPs) were captured at 0 h, 12 h and 24 h. Further the captured images were analyzed by Image J software.

Colony formation assay

The colony formation assay is capable of evaluating *in vitro* cell death based on the ability of a single cell to transform into a colony. Briefly, cells were seeded as single cells (1000 cells/well) in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h. Cells were treated with two different concentrations (0.1 and 1 µg/mL) of AgNPs at 37°C for 14 days. At the end of the incubation period, the cells were washed and fixed with methanol for 5 min, and then stained with 0.1% crystal violet for 15 min and colony formation in each dish was photographed. The clonogenic index was then determined by counting the cell colonies in each well.

Results

Biosynthesis of R-AgNPs and Characterization

In this study, rose hip extract was used to synthesis of R-AgNPs. Figure 1A shows silver nitrate, rosehip extract and R-AgNPs. It was observed that

the extract had a yellowish-red color before reaction with the silver ions. After a few minutes of mixing the rosehip extract and the AgNO₃ solution, a brown color change was observed indicating the formation of AgNPs. Further, the R-AgNPs were characterized using UV-vis spectroscopy. The UV-visible absorption spectra of R-AgNPs were measured in the range of the wavelength range 300-750 nm. A surface plasmon peak was observed at 430 nm for the R-AgNPs (Figure 1B). The surface nature of the R-AgNPs were determined by SEM. (Figure 1C). It was seen that according to EDX, there were peaks of Ag metal in the elemental composition of R-AgNPs (Figure 1D).

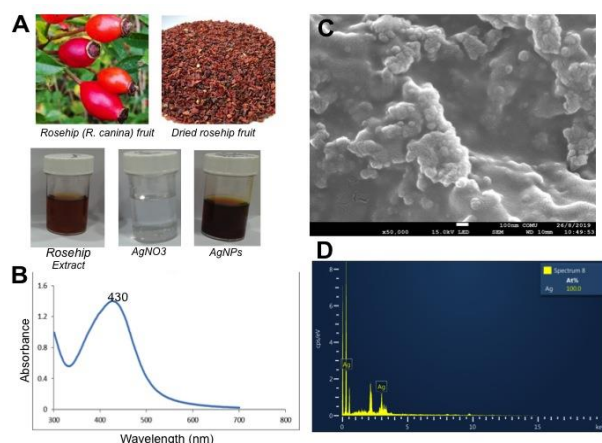


Figure 1. Biosynthesis of R-AgNPs (A), UV-vis spectrum of synthesized R-AgNPs (B), SEM image of synthesized R-AgNPs (C), EDX spectrum of R-AgNPs (D).

AgNPs-induced cytotoxicity in HT29 human colon adenocarcinoma cells

The cytotoxicity potential of the biosynthesized R-AgNPs on human colon cancer cells has been examined using the HT29 cell line. The cells were exposed to various concentrations of AgNPs for 48 h, then the cytotoxicity effects of R-AgNPs assessed using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. The MTT results showed that the AgNPs decreased cell viability in terms of dose and time compared to control group (Figure 2). The inhibitory concentration (IC₅₀ value) was calculated to be

7,98 µg/mL after 48 h of cell treatment.

In cytotoxicity studies, colony forming assay is one of the standard method for verifying clonogenic survival ability of cells exposed to potential therapeutic agent. After treatment with R-AgNPs, a colony formation assay was performed to measure the proliferation of HT29 cancer cells. HT29 cancer cells were seeded at appropriate dilutions and treated with two different concentrations of R-AgNPs (0.1 and 1 µg/mL). Cultures were kept under normal culture conditions for 14 days and the colony formations were analyzed. The results showed that R-AgNPs treatment inhibited significantly the colony forming ability of HT29 cells in a dose dependent manner (Figure 3).

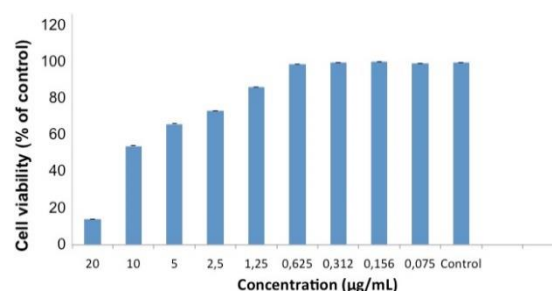


Figure 2. The results of the MTT assay in HT29 colon cancer cells treated with R-AgNPs for 48 h.

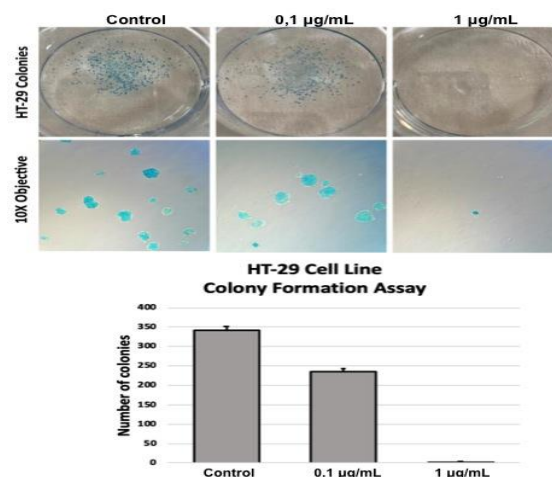


Figure 3. Effect of R-AgNPs on clonogenicity of HT29 colon cancer cells. Colony formation was analyzed by crystal violet staining (A) The clonogenic index was determined by counting the cell colonies in each well (B).

Metastasis is a hallmark of cancer progression and the leading cause of mortality among cancer patients (Hanahan and Weinberg, 2011). The migration of cancer cells is the first step in metastasis, and these process called as tumor invasion (Clark and Vignjevic, 2015). The in vitro scratch assay is a simple and commonly used method to measure cell migration (Liang et al., 2007). Thus, we have used in vitro scratch assay to evaluate the effect of R-AgNPs on cell migration. Our results showed that the R-AgNPs treatment reduced migration ability of colon cancer cells HT29 at period of 12h and 24h. R-AgNPs at 1 µg/mL concentration showed more effective inhibitory cell migration determined through scratch assay (Figure 4).

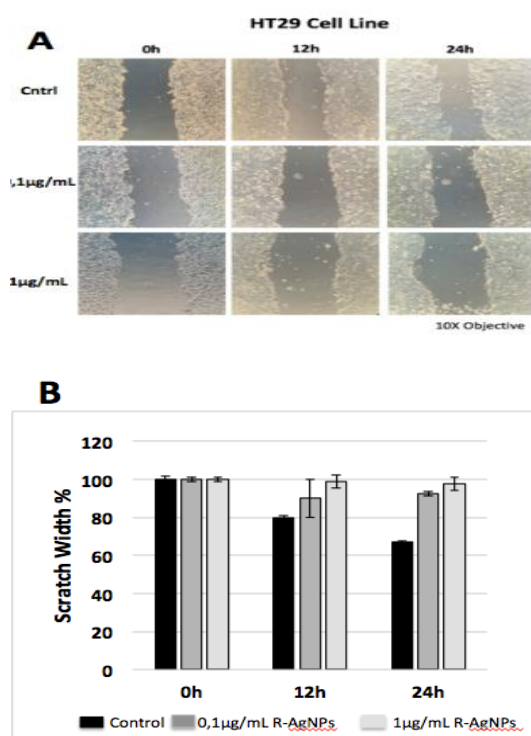


Figure 4. Effects of R-AgNPs on HT29 colon cancer cell migration, assessed by scratch assay. HT29 cells were imaged with a inverted microscope (original magnification, $\times 10$) at 0, 12 and 24h post-scratching. The images were analyzed by Image J software.

Discussion

Metal nanoparticles are sophisticated agents with a broad range of applications in various field. In

particular, silver nanoparticles have great potential as antimicrobial agents, diagnostic tools, imaging, biomedical device coating tools, drug and gene delivery carriers in nanomedicine (Panacek., 2006). Different methods are available for the synthesis of silver nanoparticles. However, the use of highly toxic and harmful to the environment materials is a necessity in many methods used in the production of silver nanoparticles. Furthermore, nanoparticle production with these methods is limited, expensive and harmful to the environment due to high-energy dissipation (Mathur., 2017). The biological method used in the production of nanoparticles uses biological resources such as plants, algae, fungi, yeasts and bacteria.

In this study, we tried to define the synthesis of R-AgNPs with rosehip extract and then further use of synthesized nanoparticles for clinical purposes. The synthesized R-AgNPs were characterized *via* UV-vis spectrophotometry and SEM. It is known that the characteristic absorption peak of AgNPs is centered at 400-450 nm depending on the size and distribution of the nanoparticles (Anandalakshmi et al., 2016). In our study, an absorption peak at 430 nm was observed, suggesting that the synthesized R-AgNPs were pure. It is well known that a strong surface plasmon peak is observed in the presence of various metal nanoparticles with a width of 2-100 nm (Sastry et al., 1997; Sastry et al., 1998).

Recently, many studies have suggested that the biosynthesized silver nanoparticles from plant extracts have a encouraging cytotoxicity effect against tumor cells (Venugopal et al., 2016; Das et al., 2013; Behboodi et al., 2018; Alavi and Karimi, 2017). In the literature, the cytotoxic and anticancer effects of the extracts obtained from *Rosa canina* have been reported against several cancer cells (Kilinc et al., 2019; Turan et al., 2018; Jiménez et al., 2016). The plant extracts used in these studies were able to inhibit the growth of cancer cells at much higher concentrations than nanoparticles. There is only one study showing the use of *Rosa canina* in silver nanoparticle synthesis and a different method has been used. However,

the effects of nanoparticles on cancer cells were not evaluated in this study (Pulit et al., 2014).

In our study, silver nanoparticle synthesis was performed for the first time by using *Rosa canina* extract and its anti-cancer and anti-metastatic effects were evaluated on HT29 colon cancer cells. The *in vitro* cytotoxic effect of R-AgNPs and cell inhibition (%) was evaluated by MTT assay compare to the control group. Untreated cells constituted the control group. The results of MTT assay showed that the increasing concentrations of biosynthesized R-AgNPs enhanced the inhibitory effect on the cell proliferation of HT29 cells after 48 h exposure. The IC₅₀ value of biosynthesized R-AgNPs was determined to be 7,98µg/mL. The approximately 90% cell inhibition of colon cancer cells was observed at a maximum concentration of 20 µg/mL.

Grunathan et al. (2018) reported that the narigenin-mediated synthesis of AgNPs were very effective at low concentrations against HCT116 colorectal cancer cells (IC₅₀: 5 µg/mL). *Anthemis atropatana* extract-mediated synthesis of AgNPs showed dose dependent cytotoxic effects against colon cancer cell lines (HT29) (Dehghanizade et al., 2018). Similarly, *Abutilon indicum*-mediated AgNPs exhibited dose-dependent antiproliferative effects on COLO 205 (human colon cancer) (IC₅₀: 3 µg/mL) and MDCK (normal) cells (IC₅₀: 75 µg/mL) (Mata et al., 2015). Likewise, Durai et al. (2014) reported that the *para*-hydroxybenzoate tetrahydrate (SPHT)-mediated synthesis of AgNPs showed dose- and time-dependent inhibition of cell viability on HCT15 and HT-29 colon cancer cell lines (IC₅₀: 8 µg/mL). In this study, the potential cytotoxic effect of R-AgNPs on HT29 cells after short (48 hours) and long term (two weeks) exposure were demonstrated. In addition to MTT assay (48 hours), colony formation assay was performed to evaluate cell proliferation. Colony formation assay, used to evaluate the cytotoxic effects induced after long term exposure (two weeks). R-AgNPs was added at different concentrations (0,1 and 1µg/mL) and colonies were counted and analyzed

after two weeks. The results showed that R-AgNPs inhibited HT29 colony formation as compared to the control cells (Figure 3). This result shows that R-AgNPs reduce the colony-forming potential of cancer cells and therefore can be used as an anti-cancer drug. The small number of colonies formed by cells exposed to R-AgNPs (1 µg/mL) confirmed the MTT assay cytotoxicity. In the literature, clonogenic assay data were not found in any study that tested plant-mediated AgNPs in colon cancer cells.

In this study, the R-AgNPs inhibited lateral motility of HT29 cells in dose dependent manner. According to our results, the dose of 1µg/mL inhibited lateral motility by 97.4% for 24 h (Figure 4). The R-AgNPs showed the remarkable effect on cancer cell proliferation and migration. Also, the ability of R-AgNPs to show activity even at low concentrations may make them useful for *in vivo* experiments. There are few studies investigating the anti-metastatic effects of silver nanoparticles. The results of our study are consistent with previous studies reporting that silver nanoparticles inhibit the migration of cancer cells (Hussain et al., 2019; Shruti et al., 2015; Kavaz et al., 2018; Buranasukhon et al., 2017).

In conclusion, the silver nanoparticles were successfully synthesized from *Rosa canina* extract. The biosynthesized R-AgNPs exhibited anti-cancer and anti-metastatic effects against HT29 human colon cancer cells. Based on our findings, we suggest that biosynthesized AgNPs may be promising new therapeutic agents for the treatment of human colon cancer. Further studies are required to support our findings of the anti-cancer and anti-metastatic potential of biosynthesized AgNPs *in vivo*.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

* This study was presented as an oral presentation at the 2nd International Conference on Technology and Science, 2019 on November 14- 16, 2019, Burdur-Turkey.

References

- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S.A., 2016.** Review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of Advanced Research* 7(1), 17–28.
- Alavi, M., Karimi, N., 2017.** Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using *Artemisia haussknechtii* leaf extract. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 12, 1–16.
- Albrecht, M.A., Evan, C.W., Raston, C.R., 2006.** Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry* 8, 417-32.
- Anandalakshmi, K., Venugobal, J., Ramasamy, V., 2016.** Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Petalium murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience* 6, 399–408.
- Behboodi, S., Baghbani-Arani, F., Abdalan, S., Sadat Shandiz, S.A., 2018.** Green Engineered Biomolecule-Capped Silver Nanoparticles Fabricated from *Cichorium intybus* Extract: In Vitro Assessment on Apoptosis Properties Toward Human Breast Cancer (MCF-7). *Cells. Biological Trace Element Research* 187(2), 392-402.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018.** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians* 68(6), 394-424.
- Buranasukhon, W., Athikomkulchai, S., Tadtong, S., and Chittasupho, C., 2017.** Wound healing activity of *Pluchea indica* leaf extract in oral mucosal cell line and oral spray formulation containing nanoparticles of the extract. *Pharmaceutical Biology* 55, 1767–1774.
- Cheng, B.C., Fua, X.Q., Guo, H., 2016.** The genus *Rosa* and arthritis: overview on pharmacological perspectives. *Pharmacological Research* 114, 219–234.
- Chrubasik, J.E., Roufogalis, B.D., Chrubasik, S., 2007.** Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain. *Phytotherapy Research* 21(7), 675-83.
- Clark, A.G., Vignjevic, D.M., 2015.** Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology* 36, 13-22.
- Daphne, J., Francis, A., Mohanty, R., Ojha, N., Das, N., 2018.** Green Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles using Yeast Isolates and its Characterization. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 11(1), 83–92.
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Bhattacharyya, S.S., Das, D., Khuda-Bukhsh, A.R., 2013.** Biosynthesized silver nanoparticles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101, 325–336
- Dehghanizade, S., Arasteh, J., Mirzaie, A., 2018.** Green synthesis of silver nanoparticles using *Anthemis atropatana* extract: characterization and in vitro biological activities. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46(1), 160-168.
- Durai, P., Chinnasamy, A., Gajendran, B., Ramar, M., Pappu, S., Kasivelu, G., Thirunavukkarasu, A., 2014.** Synthesis and characterization of silver nanoparticles using crystal compound of sodium parahydroxybenzoate tetrahydrate isolated from *Vitex negundo*. L leaves and its apoptotic effect on human colon cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 84, 90-9.
- Gurunathan, S., Qasim, M., Park, C., Yoo, H., Kim, J.H., Hong, K., 2018.** Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116. *International Journal of Molecular Sciences* 19(8). pii: E2269.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hussain, A., Alajmi, M.F., Khan, M.A., Pervez, S.A., Ahmed, F., Amir, S., Husain, F.M., Khan, M.S., Shaik, G.M., Hassan, I., Khan, R.A., Rehman, M.T., 2019.** Biosynthesized Silver Nanoparticle (AgNP) From *Pandanus odorifer* Leaf Extract Exhibits Anti-metastasis and Anti-biofilm Potentials. *Frontiers in Microbiology* 10, 8.
- Iravani, S., 2011.** Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* 13, 2638.
- Jiménez, S., Gascón, S., Luquin, A., Laguna, M., Ancin-Azpilicueta, C., Rodríguez-Yoldi, M.J., 2016.** *Rosa canina* Extracts Have Antiproliferative and Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. *PLoS One* 11(7), e0159136.
- Kavaz, D., Umar, H., Shehu, S., 2018.** Synthesis, characterization, antimicrobial and antimetastatic activity of silver nanoparticles synthesized from *Ficus ingens* leaf. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46(sup3), 1193-1203.

- Kilinc, K., Demir, S., Turan, I., Mentese, A., Orem, A., Sonmez, M., Aliyazicioglu, Y., 2019.** *Rosa canina* Extract has Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Human Lung and Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* 11, 1-10.
- Larsen, E., Kharazmi, A., Christensen, L.P., Christensen, S.B., 2003.** An antiinflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils *in vitro*. *Journal of Natural Products* 66(7), 994–5.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007.** In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2(2), 329.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., Rodríguez-Yoldi, M.J., 2017.** Therapeutic Applications of Rose Hips from Different *Rosa* Species. *International Journal of Molecular Science* 18(6), pii: E1137.
- Mata, R., Nakkala, J.R., Sadras, S.R., 2015.** Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128, 276–286.
- Mathur, P., Jha, S., Ramteke. S., Jain, N.K., 2017.** Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 12, 1–12.
- Panacek, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizúrova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T., Zboril, R., 2006.** Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 16248–53.
- Pulit, J., Banach, M., 2014.** Preparation of nanosilver and nanogold based on dog rose aqueous extract. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2014:658935
- Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S.L., 2003.** Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 125(46), 13940–13941.
- Sastry, M., Mayya, K.S. Bandyopadhyay, K., 1997.** pH Dependent changes in the optical properties of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles. *Colloids and Surfaces A* 127, 221. 27.
- Sastry, M., Patil, V., Sainkar, S.R., 1998.** Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in thermally evaporated fatty amine films. *Journal of Physical Chemistry B* 102(8), 1404–1410.
- Shruti, S., Jain, D. S., Athawale, R. B., Bajaj, A. N., Goel, P., Kamran, Z., et al. 2015.** Evaluation of anti-metastatic potential of Cisplatin polymeric nanocarriers on B16F10 melanoma cells. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23, 341–351.
- Slattery, M.L., 2000.** Diet, lifestyle, and colon cancer. *Seminars in gastrointestinal disease* 11, 142–6.
- Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y., 2010.** Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* 6, 257-262.
- Turan, I., Demir. S., Kilinc, K., Yaman, S.O., Misir, S., Kara, H., Genc, B., Mentese. A., Aliyazicioglu, Y., Deger, O., 2018.** Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 8(6), 394-399.
- Venugopal, K., Rather, H. A , Rajagopal, K., Shanthi, M.P., Sheriff, K., Illiyas, M., Rather, R.A., Manikandan, E., Uvarajan, S., Bhaskar, M., Maaza, M., 2017.** The impact of anticancer activity upon *Beta vulgaris* extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (Ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 167, 282-289.
- Yesilot, S., Aydin, C.A., 2019.** Silver nanoparticles; a new hope in cancer therapy?. *Eastern Journal of Medicine* 24(1), 111-116.

Saha Şartlarında Sınırlı Sığır Popülasyonunda Dermatofitozis Hastalık Aktivitesi ile Serum 25 (OH) D₃ Vitamin Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Determination of the Relationship Between Dermatophytosis Disease Activity and Serum 25 (OH) D₃ Vitamin Levels in Limited Cattle Population Under Field Conditions

Deniz ALIÇ URAL¹ , Songül ERDOĞAN^{2*} 

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fakülte Çiftliği, Aydın, Türkiye

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Öz: Bu çalışmada, dermatofitozisli sığırlarda 25 (OH) D₃ seviyelerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla çalışmaya küçük bir işletmede yer alan ve deride dermatofitozis şüpheli lezyonların bulunduğu 10 hasta ve 6 sağlıklı sığır dahil edildi. Fungal etkenin tanısı deriden temas frotisi ve koton svap ile alınan örneklerin mikroskop altında potasyum hidroksit ve mürekkep ile muamele edilerek direkt bakısı ve morfolojik tanısı da Sabouraud dextrose agarda izolasyonu ile gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, ışık mikrobunu altında yapılan direkt bakıda silindirik, hiyalin yapıda dallı hifa ve artrosporların görüntü kayıt edilirken 2 hafta süreyle 37°C’ de inkube edilen Sabouraud dekstroz agarda küçük, kompakt, bir araya toplanmış beyazdan griye değişen koloniler ve ışık mikrobunu altında Narayan boyama ile muamele edilen kolonilerin dallanmış boynuz benzeri hifalar, rat kuyruğu şeklindeki makrokonidialar ve gözyaşı şeklindeki mikrokonidiaların görülmesiyle *T. verrucosum*’ a ait kesin morfolojik ayrım sağlandı. Ayrıca D vitamini seviyeleri minimum-maksimum değerler açısından bakıldığında hasta grupta (11.46-41.26 ng/mL) sağlıklı kontrol grubuna göre (49.11-112.7 ng/mL) daha düşük aralıkta tespit edildi. Sonuç olarak; sığırlarda dermatofitoz etkenleri arasında bulunan *T. verrucosum* ile enfekte olan hayvanlarda, 25 (OH) D₃ seviyesinin azalabileceği ve bu azalmanın derinin immun durumunu etkileyen parametrelerinde bir arada değerlendirilmesi ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Dermatofitozis, sığır, trikofitozis, D vitamini.

Abstract: The aim of this study was to determine 25 (OH) D₃ levels in cattle with dermatophytosis. For this purpose, 10 infected with suspected dermatophytosis lesions and 6 healthy cattle from a small-scale local farm were included in the study. The diagnosis of fungal agent was confirmed by direct microscopical analysis with supplemented in potassium hydroxide and ink solution of lesion taken from skin and also by isolation of fungal colonies on Sabouraud dextrose agar with appearance of cylindrical, hyaline branched hyphae and arthrospores under light microscopy incubated at 37°C for 2 weeks. The morphological distinction of *T. verrucosum* was obtained by the observation of horn-like branched hyphae, rat tail shaped macroconidia and tear shaped microconidia of the treated colonies. 25 (OH) D₃ intervals were also found to be lower in the infected group (11.46-41.26 ng/mL) than the healthy control group (49.11-112.7 ng/mL). In conclusion, it was thought that 25 (OH) D₃ levels may be decreased in cattle infected with *T. verrucosum* that is one of the common dermatophytosis agents and this decrease should be supported by studies to be evaluated of parameters affecting immun status of skin with 25 (OH) D₃.

Keywords: Cattle, dermatophytosis, trichophytosis, vitamin D.

*Corresponding author : Songül ERDOĞAN
Geliş tarihi / Received : 04.12.2019

e-mail : songultp.09@gmail.com
Kabul tarihi / Accepted: 20.12.2019

Giriş

Dermatofitozis (ringworm, trikofitozis) evcil ve çiftlik hayvanlarında keratinofilik mantarlar tarafından oluşturulan derinin epitel tabakasının keratinize olarak kalınlaşması ve kılların dökülmesi

ile karakterize zoonoz bir enfeksiyondur. Doğal rezervuarlarına göre, dermatofitler antropofilik, zoofilik veya jeofilik olarak sınıflandırılmaktadır (Gölçe ve ark., 1999). Sığır sürülerinde genellikle

enzootik seyretmekte olan dermofitozisin 38' den fazla türü olduğu bilinmekte birlikte bunlar arasında *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* genusuna bağlı bir grup mantar hastalığa yol açmaktadır (Quinn ve ark., 1994; Gudding ve ark., 1995; Parker ve ark., 1997; Gökçe ve ark., 1999). Bu aile içerisinde ruminantlarda *Trichophyton verrucosum* en sık izole edilen etken olup ülkemizdeki zoonoz vakaların %2-4.2 'sinin aynı etken kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Koçoğlu ve ark., 2007; Dilek ve ark., 2009; Kırmızıgül ve ark., 2009).

Sığırlarda dermatofitoz salgınlarnın çoğu sonbahar ve kış aylarında, kalabalık barındırma, yemlik ve duvar gibi enfekte nesnelere temasından dolayı daha fazla görülmektedir. Bir yaştan altındaki sığırlar, özellikle transport gibi zorlu koşullar altında ve süttten kesim sırasında enfeksiyona daha duyarlıdır (Moretti ve ark., 2013). Ülkemizde yapılan bir çalışmada hastalığın bir yaştan küçük hayvanlarda erişkinlere göre daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (İmren ve Şahal, 1994).

Hastalığıdaki lezyonlar enfeksiyona yol açan suş ya da türlerinin virulensi, çevresel faktörler ve konakçıda oluşan metabolit ürünlere bağlı olarak daha çok baş ve boyun bölgesinde deriden türeyen 1-3 cm boyunda yuvarlak griden beyaza değişen renkte kabuklanma ile karakterize lezyonlarla neden olmaktadır (Medleau ve ark., 1993; Wabacha ve ark., 1998; Chermette ve ark., 2008).

Özellikle enfeksiyöz karakterdeki hastalıklar başta olmak üzere hastalıkların seyrinde vitamin D [25 (OH) D₃] yetmezliğinin risk faktörü olduğu belirtilmektedir (Ginde ve ark., 2009; Braun ve ark., 2011). Benzer şekilde deri hastalıklarında da 25 (OH) D₃' nin etkisi bilinmektedir (Umar ve ark., 2018). Bilindiği üzere 25 (OH) D₃ vitamininin etkisi çoğunlukla kalsiyum metabolizmasıyla ilişkili olmasına rağmen (Horst ve ark., 1994; NRC, 2001) son dönemlerde artan çalışmalar ışığında immün ve metabolik fonksiyonları da ortaya konulmuştur (Nelson ve ark., 2012; Sucupira ve ark., 2019). Nitekim ülkemizde deri hastalıklarında Serum 25 (OH) D₃ Vitamin seviyelerine yönelik gerçekleştirilen bir retrospektif değerlendirmede

dermafitozis saptanan hastalarda D vitamini seviyelerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Çiftçi, 2018). Zoonoz olan bu hastalığa ilişkin sığırlardaki yaygınlığı düşünüldüğünde, ruminantlarda dermatolojik hastalıklarda Serum 25 (OH) D₃ Vitamin ve etkisine yönelik bir araştırma ile karşılaşılmamıştır. Bu saha çalışmasında, Aydın sınırları içerisinde yer alan coğrafik lokalizasyonda vatandaş elinde yetiştirilen bir çiftlikte dermatofitozisli sığırlarda Serum 25 (OH) D₃ Vitamin seviyelerinin ölçülmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışma dizaynı

Bu çalışma Aydın' nın Yenipazar ilçesinde yeralan 30 baş sığır ve 50 baş koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı küçük ölçekli bir işletmede gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen hasta sığırlarda (n=10) deri lezyonları dikkate alınırken, lezyon görülmeyen hayvanlar sağlıklı kontrol grubuna (n=6) dahil edildi. Hayvanlara yönelik tür, yaş ve cinsiyet bilgileri kayıt altına alındı. Lezyonlardan etken izolasyonu ve mantar kültürü için gerekli örneklerle birlikte D vitamini analizi için serum örnekleri toplandı. Alınan örnekler fakültemize transfer edilerek merkez laboratuvarında analizler gerçekleştirildi.

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)' nun 64583101/2016/169 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir.

Etken tayini

Kesin tanı, deriden alınan koton svap ile temas frotisi örneklerinin, a) direkt mikroskopik bakıda potasyum hidroksit ve mürekkep solüsyonu ile direkt muamelesi sonrası, b) *T. verrucosum* türlerinin Sabouraud dextrose agarında (kloramfenikol, actidione ve tiyamin ilaveleri ile) izolasyonunu müteakip, c) detaylı izolat morfolojisinin mikroskopisi (Narayan boyası ile hifa, mikrokonidia ve makrokonidia ayırımı) teşhise yönelik değerlendirilmesi mümkün kılındı (Pal 2004; 2007; 2017).

D vitamini analizi

Vena jugularis' ten alınan kan örnekleri uygun koşullarda laboratuvara taşındıktan sonra 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıştırıldı. Bekletilmeksizin ayrıştırılan serum örneklerinden ticari test kitleri

aracılığıyla (Savant marka Bejing Savant Biotechnology Co) Serum 25 (OH) D3 Vitamin seviyeleri flöresan immuno kromotografik yöntem ile belirlendi (Resim 1).



Resim 1. D vitamini analizlerinin yapılışı

Bulgular

Demografik bulgular

Saha çalışması kapsamına alınan olgulara ilişkin demografik bilgiler Tablo 1'de gösterildi. Cinsiyetlerin gruplara göre dağılımı incelendiğinde dişi/erkek sayısı sırasıyla; trikofizotis grubu için 6/4, sağlıklı kontrol grubu için 5/1 olarak değerlendirildi.

Klinik ve laboratuvar bulguları

İşletme sahibinden alınan bilgiler ışığında son üç aydır lezyonların varlığından bahsedildi. Yapılan klinik muayenede hasta hayvanların baş ve boyun bölgelerinde farklı boyutlarda yuvarlak, gri-beyaz renkte kabuklu ve alopesik lezyonlar görüldü (Resim 2). Vücut sıcaklıkları, solunum sayıları ve kalp atım sayıları normal değerlerde kayıt edildi. Hayvanların iştah, ruminasyon ve dışkılamalarının normal olduğu görüldü.

Potasyum hidroksit ve mürekkep ile yapılan muamele sonrası ışık mikroskobu altında incelenen örneklerde ince, silindirik, hyalin yapıda dallı hifa ve artrosporların mikroskopik görüntü ile dermofitozisten şüphelenildi. Kesin tanı için yapılan ve 2 hafta süreyle 37°C' de inkube edilen Sabouraud dekstroz agarda küçük, kompakt, bir araya toplanmış beyazdan griye değişen koloniler elde edildi. Agarın besleme sahasında diğer mikrobiyal üremelere rastlanılmadı. Işık mikroskobu altında Narayan boyama ile muamele edilen kolonilerin dallanmış boynuz benzeri hifalar, rat kuyruğu şeklindeki makrokonidialar ve gözyaşı şeklindeki mikrokonidiaların görülmesiyle *T. verrucosum*' a ait kesin morfolojik ayırım sağlandı.

D vitamini tayinine yönelik minimum-maksimum değerler açısından yapılan incelemede Serum 25 (OH) D3 Vitamin seviyeleri; hasta grupta 11.46-41.26 ng/mL, sağlıklı kontrol grubunda ise 49.11-112.7 ng/mL olarak tespit edildi.

Tablo 1. Çalışma kapsamına alınan sığırların demografik dağılımı

Hastalık	Yaş	İrk	Cinsiyet	D vitamini (ng/ml)
Trikofitozisli	5	yerli	dişi	16
	1	holstein	dişi	36.19
	1	simental	erkek	21.40
	7	yerli	erkek	30.12
	4	yerli	dişi	11.46
	6	montofon	dişi	15.30
	2	holstein	dişi	27.01
	4	holstein	1	19.16
	0	yerli	erkek	41.26
	2	melez	erkek	16.51
Sağlıklı	4	yerli	dişi	112.7
	3	simental	dişi	100.8
	2	yerli	dişi	66.31
	5	holstein	dişi	80.12
	4	yerli	erkek	49.11
	0	yerli	dişi	91.13



Resim 2. *Trichophyton verrucosum* ile enfekte sığırların baş-boyun bölgelerindeki farklı boyutlarda, yuvarlak, griden beyaza değişen renk ile karakterize alopesik lezyonların görünümü

Tartışma

Sığırlarda deri hastalıkları primerde nadir olarak hayati risk oluştursa da doku hasarına bağlı bakteriyel komplikasyonlar ve deride meydana gelen hasara bağlı satış değerini kısıtlaması gibi sebeplerden dolayı hayvancılık endüstrisinde kayıplara neden olmaktadır (Thomsett, 2004). Sığırlarda deri hastalıkları çeşitli spesifik ve non-spesifik nedenlere bağlı gelişmektedir. Bunlar arasında dermatofitozis en sık karşılaşılan mantar enfeksiyonu olmakla birlikte primer etken *T. verrucosum* olarak karşımıza çıkmaktadır (Quinn ve ark., 1994; Pal, 2004; 2007; 2017). Dermatofitozis, çalışmalarda da belirtildiği gibi ülkemizde yaygın seyreden deri hastalığı olup patofizyolojisi ve sağaltımını kapsayan çeşitli çalışmalarla güncelliğini korumaktadır (Çenesiz ve ark., 2007; Paşa ve Kıral, 2009; Aslan ve ark., 2010; Yılmaz ve Aslan., 2010; Balıkcı ve Gazioğlu, 2017). Çalışmamızda benzer şekilde *T. verrucosum*' a bağlı trikofitozis ile karşılaşmışır.

Trikofitozisin etiyojisine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar çeşitli iz ve mineral eksikliklerinin durumunu ve sağaltımı kapsarken (Kojouri ve ark., 2009) 25 (OH) D₃ vitamininin seviyesinin belirlendiği bir veriye rastlanılmamıştır. Günümüzde 25 (OH) D₃ vitamininin deri hastalıklarındaki önemli rolü bilinmekle birlikte (Umar ve ark., 2018) ülkemizde beşeri alanda yapılan yalnızca bir çalışmada dermatofitozisli insanlarda 25 (OH) D₃ vitamini seviyesinin düşük olduğu ancak bu durumun olası kronik enfeksiyon ve immunsupresif ajan kullanımından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (Çiftçi, 2018).

Bu noktada dermatitisle seyreden yangısal hastalıkların 25 (OH) D₃ vitamini ile olan ilişkisini kısaca irdelemek gerekirse; düşük 25 (OH) D₃ vitamini seviyesinin sıklıkla proinflatuvar yanıtı eşlik ettiği ve bu durumun yangısal sitokinler ve akut faz proteinlerinin artışıyla karakterize olduğu bildirilmektedir (Ferrucci ve ark., 2005; Franceschi ve ark., 2000). Trikofitozisli sığırlarda artış gösteren akut faz proteinlerinden haptoglobulin ve serum amiloid A seviyelerinin hafif şiddette de olsa enfeksiyonu desteklediği

görülmektedir (Balıkcı ve Gazioğlu, 2017). Buradan da yola çıkılarak kısıtlı sayıda literatür ile karşılaşılan trikofitoziste oluşan yangısal durumun varlığı, çalışmamızda elde edilen sağıklılara göre hasta sığırladaki düşük 25 (OH) D₃ vitamin seviyelerinin açıklaması olabilmektedir. Bununla birlikte, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, 25 (OH) D₃ vitamini seviyelerinde meydana gelen artışın T yardımcı hücreleri 1 (Th1) profilindeki hücrelerin inhibisyonuna ve Th1'den T yardımcı hücreleri II (Th2) seviyesine geçişte hızlanmalara sebep olduğu bununla birlikte Th2 profilindeki hücrelerden özellikle fibroblast düzeyinde uyarımlar ile etkilediği birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Bikle, 2008; Griffin ve Kumar, 2003; Gombart, 2009; Sun ve ark., 2006; Yamshchikov ve ark., 2009). Diğer taraftan beşeride yapılan çalışmalarda sağıklı derinin kendisini koruması amacı ile ürettiği antimikrobiyal peptitlerin (α ve β -defensinler, katelisinidin) önemi, araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Cowland ve ark., 1995; Larrick ve ark., 1995). Heliks biçimli olarak ilk kez tanımlanan bu peptitlerden katelisinidin (LL-37) 37 aminoasit ihtiva eden uzun bir peptit olduğu ve yalnızca antimikrobiyal değil bununla birlikte antiviral ve candida enfeksiyonlarına karşıda koruyucu etkilerinin bulunduğu belirtilmektedir (Gudmundsson ve ark., 1996; Braf ve Gallo, 2006). Deri üzerindeki epitel hücreleri ve nötrofiller tarafından LL-37 sentezinin indüklendiği ve UV ışınları altında 25 (OH) D₃ vitamini sentezi ile birlikte LL-37 peptitlerinin yaralı deri dokularında miktar artışlarına zorlandıkları bilinmektedir (Schauber ve ark., 2007). Derinin olası enfeksiyon durumlarında savunma yanıtını güçlendirebilmesi amacı ile katelisinidin miktarlarındaki artış gereksinimleri yalnızca yeter düzeyde 25 (OH) D₃ vitamini bulunduğu durumlarda sağıklı olarak gelişebilmekte ve söz konusu durumun birbiri ile bağımlı olduğu görülmektedir. Benzer şekilde psoriasis bulunan hastalarda 25 (OH) D₃ vitamini ve katelisinidin seviyelerinin düşük olduğu da belirtilmekte ve literatürlerde açıklanan tespitlerin doğruluğunu göstermektedir (Reinhorz ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda Serum 25 (OH) D₃ Vitamin seviyeleri (minimum-maksimum değerler

açısından) hasta grupta 11.46-41.26 ng/mL, sağlıklı kontrol grubunda ise 49.11-112.7 ng/mL olarak tespit edildi. Çalışmamızda *T. verrucosum* ile enfekte olan hayvanlarda da benzer şekilde 25 (OH) D₃ vitamini seviyeleri sağlıklı hayvanlara göre düşük bulunmuş ve söz konusu azalmaların gerek Th1/Th2 sitokin yanıt ve yangısal durum gerekse de katelisidin sentezine bağlı 25 (OH) D₃ vitamininin tüketimi ile ilişkili olarak azaldığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sığırlarda dermatofitoz etkenleri arasında bulunan *T. verrucosum* ile enfekte olan hayvanlarda 25 (OH) D₃ vitamini seviyesinin azalabileceği ve bu azalmanın derinin immun durumunu etkileyen parametrelerinde bir arada değerlendirilmesi ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

Kaynaklar

Aslan, Ö., Aksoy, A., İça, T., 2010. Dermatofitozisli genç sığırlarda serum çinko, bakır ve mangan seviyeleri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 7(1), 29-33.

Balıkçı, E., Gazioğlu A., 2017. Trikofitozisli Sığırlarda Haptogloblin ve Serum Amyloid A Düzeyleri ve Nigella Sativa'nın Antiinflatuar Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi; 31(2): 93-96.

Bikle, D.D., 2008. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. Current Opinion In Nephrology And Hypertension 17(4), 348-352.

Braff, M.H., Gallo, R.L., 2006. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. In Antimicrobial Peptides and Human Disease 306: 91-110.

Braun, A., Chang, D., Mahadevappa, K., Gibbons, F.K., Liu, Y., Giovannucci, E., Christopher, KB., 2011. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and mortality in the critically ill. Critical Care Medicine 39: 671-677.

Chermette, R., Ferreira, L., Guillot, J., 2008. Dermatophytoses in animals. Mycopathol 166: 385-405.

Cowland, JB., Johnsen, AH., Borregaard, N., 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. FEBS Letters 368(1): 173-176.

Çenesiz, S., Nisbet, C., Yarım, GF., Arslan, HH., Çiftçi, A., 2007. Trikofitozisli ineklerde serum

adenozin deaminaz aktivitesi (ADA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 54: 155-158.

Çıfci, N., 2018. D vitamini düzeylerinin deri hastalıkları üzerine etkisinin retrospektif değerlendirilmesi. Kocaeli Tıp Dergisi, 7(3), 47-54.

Dilek, N., Yücel, A.Y., Dilek A.R., Saral, Y., Toraman. Z.A., 2009. Fırat Üniversitesi Hastanesi Dermatoloji Kliniği'ne Başvuran Hastalardaki Dermatofitoz Etkenleri - Orijinal Araştırma. Turkish Journal of Dermatology. 3: 27-31

Ginde, A.A., Mansbach, J.M., Camargo, C.A., 2009. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Archives of Internal Medicine 169(4), 384-390.

Gombart, A.F., 2009. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. Future Microbiology, 4(9), 1151-1165.

Gökçe, G., Şahin, M., Irmak, K., Otlı, S., Aydın, F., Genç, O., 1999. Sığır Trichophytosis'inde profilaktik ve terapötik amaçla aşı kullanımı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 5: 81-86.

Griffin, M. D., Kumar, R., 2003. Effects of 1 α , 25 (OH) 2D₃ and its analogs on dendritic cell function. Journal of Cellular Biochemistry 88(2), 323-326.

Gudding, R., Lund, A., 1995. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. The Canadian Veterinary Journal, 36(5), 302.

Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., Salcedo, R., 1996. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. European Journal of Biochemistry 238(2), 325-332.

İmren, H.Y., Şahal, M., 1994. Trikofiti. In: Alaçam, E., Şahal, M., (Eds.), Veteriner İç Hastalıkları. Medisan, Ankara, pp. 213-215.

Kırmızıgül, A.H., Gökçe, E., Özyıldız, Z., Büyük, F., Şahin, M., 2009. Sığırlarda dermatofitozis tedavisinde enilconazole'ün (%10) topikal kullanımı: klinik, mikolojik ve histopatolojik bulgular. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 15(2): 273-277.

Koçoğlu, E., Karabay, O., Kırmusaoğlu. S., 2007. Yüzeyel mantar etkeni olarak izole edilen mantarlar: iki yıllık verilerin değerlendirilmesi. In: Klimik XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Ankara, 296.

- Kojouri, G.A., Ebrahimi, A., Zaheri, M., 2009.** Zinc and selenium status in cows with dermatophytosis. *Comparative Clinical Pathology* 18(3), 283-286.
- Larrick, J.W., Hirata, M., Zhong, J., 1995.** Wright SC. Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology* 1: 65-72.
- Medleau L, Ristic Z, White-Weathers NE., 1993.** Fungal Dermatoses. In: Howard (Ed.), *JL Current Veterinary Therapy 3 & Food Animal Practice*, WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 890-894.
- Moretti, A., Agnetti, F., Mancianti, F., Nardoni, S., Righi, C., Moretta, I., 2013.** Dermatophytosis in animals: Epidemiological, clinical and zoonotic aspects. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 148: 563-572.
- Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D, Sacco, R.E., Nonnecke, B.J., 2009.** Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* 4(3): 181-196.
- Pal, M., 2007.** Dermatophytosis in an Adult Cattle due to *Trichophyton verrucosum*. *Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science* 1(1): 1-3.
- Pal, M., 2004.** Efficacy of Narayan stain for morphological studies of moulds, yeasts and algae. *Revista iberoamericana De micologia*, 21, 219.
- Pal, M., 2017** *Veterinary and Medical Mycology*, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India.
- Parker, W.M., Yager, J.A., 1997.** Trichophyton dermatophytosis--a disease easily confused with pemphigus erythematosus. *The Canadian Veterinary Journal* 38(8), 502.
- Paşa, S., Kiral, F., 2009.** Serum Zinc and Vitamin A Concentrations in Calves with Dermatophytosis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(1): 9-12.
- Quinn, P.J., Carter, M.E, Markey, B., Carter, G.R. 1994** *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolfe Publishing, London, UK. pp. 1164-1167.
- Reinholz, M., Ruzicka, T., Schaubert, J., 2012.** Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Annals of dermatology* 24(2): 126-135.
- Schauber, J., Dorschner, R.A., Coda, A.B., Büchau, A.S., Liu, P.T., Kiken, D., Zügel, U., 2007.** Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* 117(3), 803-811.
- Songer, G.J., Post W.K., 2005.** *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal disease*, Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 361 -363.
- Sucupira, M.C.A., Nascimento, P.M., Lima, A.S., Márcia de Oliveira, S.G., Della Libera, A.M.M.P., Susin, I., 2019.** Parenteral use of ADE vitamins in prepartum and its influences in the metabolic, oxidative, and immunological profiles of sheep during the transition period. *Small Ruminant Research*, 170, 120-124.
- Sun, J., Kong, J., Duan, Y., Szeto, F. L., Liao, A., Madara, J.L., Li, Y.C., 2006.** Increased NF- κ B activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(2), E315-E322.
- Thomsett, L.R., 2004.** *Skin Conditions*. In: Andrews, A.H, Blowey, R.W, Boyd, H, Eddy, R.G (Eds.), *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Blackwell Science, USA, pp. 875.
- Umar, M., Sastry, K. S., Al Ali, F., Al-Khulaifi, M., Wang, E., Chouchane, A.I., 2018.** Vitamin D and the pathophysiology of inflammatory skin diseases. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(2), 74-86.
- Wabacha, J.K., Gitau, G.K., Bebora, L.C., Bwanga, C.O., Wamuri, Z.M., Mbithi, P.M., 1998.** Occurrence of dermatomycosis (ringworm) due to *Trichophyton verrucosum* in dairy calves and its spread to animal attendants. *The Journal of the South African Veterinary Association* 69: 172-183.
- White, J.H., 2008.** Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infection and Immunity* 76(9), 3837-3843.
- Yamshchikov, A., Desai, N., Blumberg, H., Ziegler, T., Tangpricha, V. 2009.** Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocrine Practice*, 15(5), 438-449.
- Yılmaz R.E., Aslan Ö., 2010.** Sığırlarda mantar hastalığının sağaltımında neğuvon ve whitfield's merhemini birlikte kullanımının etkinliğinin araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 19(3): 175-183.

Mercanköşk (*Origanum Onites L.*) Bitkisinin Bazı Gıda Patojenleri Üzerine Antibakteriyel Etkinliğinin Saptanması**

Detection of Antibacterial Effect of Oregano Plant (*Origanum Onites L.*) on Some Food Pathogens

Ahmet Hulusi DİNÇOĞLU^{1*} 

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Burdur, Türkiye

**"Bu çalışma 4-8 Ekim 2017 tarihinde Kuşadası/Aydın'da düzenlenen 7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresinde özet bildiri olarak sunulmuştur".

Öz: Bu çalışma mercanköşk (*Origanum onites L.*) bitkisinin çeşitli gıda patojenleri üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. 5 değişik çözügede (aseton, etanol, metanol, kloroform, kaynatılmış su) ekstrakte edilen bitkinin 5 farklı bakteriye (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis ve *Brucella* spp.) karşı etkisi disk-diffüzyon tekniği kullanılarak incelendi. Bu ekstraktların 4 bakteri türüne (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* ve *Salmonella* Enteritidis) karşı farklı düzeylerde etki gösterdiği, *Brucella* spp.'ye karşı ise antibakteriyel bir etki ortaya koymadığı saptanmıştır. Oluşan zon çapları itibarıyla etanol ile hazırlanmış ekstraktın *Staphylococcus aureus* üzerine gösterdiği etkinin en yüksek düzey (18 mm), kloroform ekstraktının *Campylobacter jejuni*'ye gösterdiği etkinin en düşük düzey (9 mm) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak mercanköşk ekstraktlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve gıda koruma alanında kullanılabileceği ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mercanköşk, ekstraksiyon, patojen, antibakteriyel.

Abstract: This study was performed to detect antibacterial effects of oregano plant (*Origanum onites L.*) on various food pathogens. Effect of plant extracted in 5 different solvents (acetone, ethanol, methanol, chloroform, boiling water) was investigated with disc-diffusion technique for 5 different bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis and *Brucella* spp.). It was observed that these extracts exhibited antibacterial effect at different levels for 4 bacteria species (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* Enteritidis) but not for *Brucella* spp. Extract with ethanol realized at the highest antibacterial effect (18 mm) on *Staphylococcus aureus* according to zone diameter. Extract with chloroform showed at the lowest antibacterial effect (9 mm) on *Campylobacter jejuni* according to zone diameter. These results showed that oregano extracts had antibacterial effect on some pathogens and they can be used for food preservation.

Keywords: Oregano, extraction, pathogen, antibacterial.

*Corresponding author : Ahmet Hulusi DİNÇOĞLU e-mail : adincoglu@mehmetakif.edu.tr
Geliş tarihi / Received : 08.12.2019 Kabul tarihi / Accepted: 24.12.2019

Giriş

Günümüzde tıbbi bitkiler, geleneksel sağaltım yöntemlerinin en aktif unsurları olarak bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verileri gelişmekte olan ülkelerde insanların %80'nin bu sağaltım yöntemlerini kullandığını ve 3.3 milyar insanında da tıbbi bitkilerden sağaltım aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Eloff, 1998). Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de tıbbi açıdan önemli bulunan bitkiler yüzyıllardan

beri halk arasında kullanılmaktadır. DSÖ'nün 91 ülkenin farmokopelerinde (kodeks) ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bundan ancak 500 kadarının tarımsal üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Türkiye on bine yakın bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerden biri olmanın yanı

sıra bu konuda köklü bir kültüre de sahiptir (Baytop, 1984).

Birçok bitki mikrobiyolojik ve farmakolojik yönlerden hatta biyolojik savaşın gündemde olduğu son yıllarda bitki savunma mekanizması bakımından da çok yönlü araştırılmaktadır. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Vanderbank, 1949). Bu araştırmalar, bitkisel ilaçların daha etkili, daha toksik ve daha pahalı olan sentetik ilaçlar ile bir arada kullanımlarında tamamlayıcı olarak rol oynamalarına olanak sağlamış, tek başlarına ise alternatif sağaltım aracı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistemlerin infeksiyonlarında iyileştirici ve antiseptik amaçlı olarak kullanımlarını gündeme getirmiştir. Bu yönüyle antibakteriyel aktiviteye sahip bitkilerin bakteriyel orijinli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği ve hatta yiyecek depolarındaki bakteriyel kontaminasyonu önlemek gibi özellikli bir işleve sahip olabileceği bildirilmektedir (Verastegui ve ark., 1996).

Ayrıca baharat özelliğindeki bazı bitkilerin içerdikleri uçucu yağlar ile gıdaların organoleptik özelliğinde kayba neden olmaksızın bakteriyel bozulmayı geciktirdikleri ve buna bağlı olarak koruyucu amaçla kullanıldıkları saptanmıştır (Dorman ve Deans, 2000). Bu durumda bitkiler, mevcut bu etkilerinin yanı sıra yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi için yapılan araştırmalarda model olarak da kullanılabilirler (Sindambiwe ve ark., 1999). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların %25'ini oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark., 1985).

Baharatlardaki antibakteriyel etkinin, daha çok uçucu yağlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu etkinin uçucu yağda bulunan bir ya da birkaç bileşikten kaynaklandığı belirtilmiştir (Akgül ve ark., 1989; Knobloch ve ark., 1989).

Gıda, ecza, parfüm ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılan baharatların ve uçucu yağlarının, 1980'li yıllardan başlayarak antibakteriyel etkileri açısından

birçok araştırmada denenmiştir (Zaika ve ark., 1983; Pauli ve Knobloch, 1987; Zaika, 1988). Baharatlar ve türev ürünlerinin etkileri (ekstraktlar, uçucu yağlar ve bileşenleri) genellikle in vitro ortamda farklı bakteri ve fungus türlerine karşı kullanılmıştır. Bu çalışmalarda en etkili bitkilerin karanfil, tarçın, sarımsak, hardal, sater, kekik ve mercanköşk olduğu tespit edilmiştir (Benjilali et al, 1984; Deans ve Soboda, 1990).

Bu çalışmada kullandığımız mercanköşk bitkisi (*Origanum onites* L.) timol benzeri kokuya sahip olduğu için kekik olarak da anılır. Ülkemizde 21 origanum türü bulunmaktadır. Bunlardan biri de mercanköşk veya İstanbul kekiği olarak bilinen *Origanum onites* L.'dir ve Türkiye'nin önemli ihraç ürünleri arasındadır (Akgül, 1993). Mercanköşk yarı çalımı, 65 cm'ye kadar boylanan, sert tüylü bir bitkidir. Dalların sayısı her gövdede 10 çifte kadar olmakta ve boyları 13 cm'ye kadar çıkmaktadır. Kayalık tepeler ve yamaçlarda genellikle kireçtaşı üzerinde, bazen gölge yerlerde, deniz seviyesinden 1400 m yükseklikte yetişmektedir (Davis, 1982).

Türkiye'de yetişen mercanköşk türleri genellikle baharat, çesni ve halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu kekik türleri arasında en çok kullanılanları, *O. majorana* L., *O. vulgare* L., ve *O. onites* L.'dir (Baytop, 1984). "Ak kekik, peynir kekiği, güveyotu, mercanköşk, İstanbul kekiği" gibi adlar ile bilinen *Origanum onites* L. bitkisi genellikle kekik olarak bilinmektedir. Midevi, sedatif, antimikrobiyel, antiseptik, antihelmintik, kardiovasküler, stimulan özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir (Cingi ve ark., 1991). Ayrıca et ve et ürünlerinde, pizza, çorba, salata ve birçok gıda ürününde kullanılmaktadır. Mercanköşk yağı ve oleoresini alkollü içki ve alkolsüz içeceklerde ve ayrıca kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır.

Kekiğin su destilasyon ürünü olan uçucu yağı ve yağ altı suyu (kekik suyu) mide, bağırsak rahatsızlıklarına (karn ağrısı, bulantı, hazımsızlık), şeker hastalığı gibi endokrin sistem rahatsızlıklarında safra artırıcı özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Aydın ve ark., 1993). Kekik çay olarak kullanıldığında sindirimi kolaylaştırıcı ve gaz giderici bir etki yaptığı,

bileşimindeki fenolik asitler ve monoterprenik fenollerin antioksidan özellikte olduğu belirtilmektedir (Başer, 2001). Ultee ve ark. (2002), *Origanum eterik* yağında bulunan karvakrol, timol ve kimeninin antimikrobiyal etkilerinin olduğunu; bu etkinin bakteri hücre duvarı üzerinde gerçekleştiğini ve iyon konsantrasyonuna bağlı olarak ozmotik basıncın değişmesi sonucunda sitoplasmik membran yapısının bozulması ile birlikte ATP sentezinin durmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, 5 farklı çözen içinde ekstraktları hazırlanmış olan mercanköşk bitkisinin 5 değişik bakteri türüne karşı antibakteriyel özelliği araştırılmıştır. Bu araştırma neticesinde elde edilecek verilerin bir sonraki adımda bu bitkinin ekstraktlarının bazı gıdalarla kombine edilerek raf ömürlerini inceleyecek olan araştırmacılara yardımcı olması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan mercanköşk bitkisi Değirmencioglu A.Ş.'den (İstanbul) temin edilmiştir. Bitki daha sonra Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı laboratuvarlarında incelenmiş ve tür tayini yapılmıştır.

Çözen olarak: Aseton %99.5 (Merck), Kloroform %99 (Merck), Metanol %99.9 (Merck), Etanol %99.9 (Merck) ve distile su (Kaynatma) kullanılmıştır.

5 farklı çözenle işleme tabii tutulan Mercanköşkün antibakteriyel aktivitesi 5 farklı bakteri üzerinde denenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Campylobacter jejuni* (ATCC 49943) ve *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. *Brucella* spp. suşu ise Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonlarından (peynir izolat suşu) alınmıştır.

Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Kuru haldeki bitkilerin yaprakları ayıklandı ve bunlar toz haline gelinceye kadar ufaltıldı. Her bir çözen için 5 farklı şişe içine 2'şer gram tartılarak ilave edildi ve üzerlerine 20 ml çözen aktarıldı. Bu karışım oda sıcaklığında (21 °C) 12 saat bekletildikten sonra filtre kâğıdından süzülerek başka bir şişeye aktarıldı ve ağzı açık bir olarak 40 °C deki etüvde çözenler tamamen uçuncaya kadar bekletildi. Şişe içinde ekstraktan geriye kalan tortunun üzerine 10 ml distile su ilave edildi ve ağzaları kapatılan şişeler otoklavda sterilize edildi.

Disklerin Hazırlanması

Bitki ekstraktlarına karşı bakterilerin duyarlılığını saptamak amacıyla disk-diffüzyon yöntemi kullanıldı (Quinin ve ark, 1994). Disk hazırlamada kullanılan emici kağıtlar (Whatman No.1) 6 mm çapında kesildi ve otoklavda 121 °C de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Bitki ekstraktı steril boş disklere 20 µl miktarında emdirildi.

Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

Suşların her biri BHI'ya (Brain Heart Infusion Broth, Oxoid CM0225) inokule edilip 37 °C'de inkübe edildi. Denemeler için 18 saatlik aktif kültürden yararlanıldı. Kültürlerdeki bakteri konsantrasyonu McFarland 0.5 standardına göre yaklaşık 1.5×10^8 cfu/ml olacak şekilde ayarlandı. Önceden hazırlanan Nutrient Agar (Merck 1.05450) besiyeri üzerine 10^{-1} dilüsyonu yapılan aktif kültürlerin ekimi yüzeyde yayma yöntemiyle yapıldı. Kısa bir süre agarın bakteri solüsyonunu emmesi beklendi.

Antibakteriyel Aktivitenin Saptanması

Ekim yapılmış her bir besiyerinin üzerine eşit mesafede toplam 3 adet disk yerleştirildi. Bunlardan en az birini farklı çözenlerin ekstraktıyla doyurulmuş diskler oluşturdu. Diğerleri ise negatif kontrol olarak kullanılan emdirilmemiş boş diskti. *Campylobacter jejuni* ihtiva eden petri anaerob (CO₂ inkübatöründe), diğerleri ise aerob ortamda 37 °C'de 24 saat süreyle (*Brucella* spp. için 37 °C'de 72 saat) inkübe edildi. Süre sonunda

besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi (Alton ve ark., 1988; Collins and Lyne, 1987).

Bu çalışmanın tüm deneysel aşamaları Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Bulgular

Araştırmamızda disk-difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkisi incelenen mercanköşk bitkisine ait 5 farklı çözümden hazırlanmış ekstraktların 5 değişik bakteriye karşı üreme inhibisyon sonuçları Tablo 1, petri plaklarındaki zon görüntüleri ise Şekil 1-4'de gösterilmiştir. Bu ekstraktların 4 bakteri türüne (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* ve *Salmonella* Enteritidis) karşı farklı düzeylerde etki gösterdiği,

Brucella spp.'ye karşı ise antibakteriyel bir etki ortaya koymadığı saptanmıştır.

Ekstraktların kullanılan bakteri türleri üzerine farklı oranlarda antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür. Oluşan inhibisyon zonlarının büyüklüğü dikkate alındığında, Etanol ile hazırlanmış ekstraktın *Staphylococcus aureus* üzerine gösterdiği etkinin en yüksek düzey (18 mm), kloroform ekstraktının *Campylobacter jejuni*'ye gösterdiği etkinin en düşük düzey (9 mm) olduğu tespit edilmiştir.

Meydana gelen inhibisyon çaplarının her bakteri grubu içinde ortalaması alınarak yapılan hesaplamada, ekstraktların *Staphylococcus aureus* üzerine diğerlerine göre daha fazla inhibisyon gösterdiği, buna karşılık en az inhibisyonun *Campylobacter jejuni*'ye karşı olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 1. Mercanköşk Bitkisinin Farklı Çözgenlerde Hazırlanmış Ekstraktlarının Antibakteriyel Etkisi

Çözgenler	Bakteriler ve Oluşan İnhibisyon Zonları (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>Brucella</i> spp
Aseton	11	14	12	11	-
Etanol	13	11	18	10	-
Metanol	12	16	16	11	-
Kloroform	10	12	14	9	-
Su (kaynatma)	13	16	17	11	-



Şekil 1. Disk-Difüzyon Yöntemi ile *E. coli*'de Oluşan Zonlar

S: Distile su, K: Kloroform, E: Etanol, M, Metanol, A: Aseton, N: Negatif kontrol



Şekil 2. Disk-Diffüzyon Yöntemi ile *S. enteritidis*'de Oluşan Zonlar
S: Distile su, K: Kloroform, E: Etanol, M, Metanol, A: Aseton, N: Negatif kontrol



Şekil 3. Disk-Diffüzyon Yöntemi ile *S. aureus*'de Oluşan Zonlar
S: Distile su, K: Kloroform, E: Etanol, M, Metanol, A: Aseton, N: Negatif kontrol



Şekil 4. Disk-Diffüzyon Yöntemi ile *C. jejuni*'de Oluşan Zonlar
S: Distile su, K: Kloroform, E: Etanol, M, Metanol, A: Aseton, N: Negatif kontrol

Tartışma

Mercanköşk bitkisine ait Aseton, Etanol, Metanol, Kloroform ve Su (kaynatılmış) ekstraktlarının 5 farklı gıda kaynaklı patojen bakteriye karşı etkisinin

incelendiği çalışmamızda ekstraksiyon türlerinin farklı antibakteriyel etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Bunun yanında aynı ekstraksiyonun çalışmada kullandığımız bakteriler üzerinde farklı etkiler ortaya koyduğu tespit edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi içinde en etkili sonucun Etanol çözgeninde *Staphylococcus aureus* karşı elde edildiği, *Brucella* spp.'ye karşı ise antibakteriyel bir etkinin ortaya çıkmadığı saptanmıştır. *Brucella* spp.'ye karşı antibakteriyel bir etkinin görülmemesi çalışmada kullandığımız bitki eksterisi konsantrasyonunun bu bakteri için yeterli düzeyde olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda esansiyel yağlar üzerinde durulmakta ve mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin varlığı vurgulanmaktadır (Akgül ve ark., 1989; Knobloch ve ark., 1989). Bu alanda yapılmış olan araştırmalara ait bulguların büyük çoğunluğu bu çalışma verilerini destekler niteliktedir. Bununla birlikte kullanılan bitkinin elde edildiği bölge, bitkinin alt türleri arasındaki farklılıklar, ekstraksiyon işlemi, uygulanan antibakteriyel etkinlik deneme yöntemi ve test edilen suşlardaki değişiklikler nedeniyle karşıt sonuçların alındığı çalışmalar da literatürde yer almaktadır.

İki *Origanum* türünden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite gözlenirken, *P. aeruginosa* üzerinde etkisiz olduğu saptanmıştır (Lisin ve ark., 1999).

Lin ve ark. (2004) ise yaptıkları bir invitro deneme ile *Origanum onites*'in su ekstraktının *Yersinia enterocolitica* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde çok iyi antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *O. majorana* ve *O. onites* türünden elde edilen uçucu yağ Gram (+) bakterilerden *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermis*, Gram (-) bakterilerden *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı denenmiş ve bu uçucu yağların yüksek oranda antibakteriyel özellikte olduğu belirlenmiştir (Aliğianis ve ark., 2001).

Origanum vulgare'nin de dahil olduğu dört farklı bitkiden elde edilen uçucu yağlar *Escherichia coli*'ye karşı denenmiş, *Origanum* ve *Thymus* türlerinden elde edilen uçucu yağların diğer iki bitkiden elde edilen yağlara göre *Escherichia coli* bakterisine daha

güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır (Burt ve Reinders, 2003).

Ülkemiz araştırmacıları da bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi konusunda önemle eğilmektedir. Örneğin Sağdıç (Sağdıç ve Özcan, 2003), kekik ve mercanköşk bitkilerinin *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiğini ifade ederken bu çalışmada mercanköşkün *Escherichia coli* O157:H7 üzerine etkisiz kaldığını ifade etmiştir. Yine Aydın (2008), 26 bitki türü ekstraktını 4 farklı bakteriye karşı denemiş, mercanköşkün *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı çok güçlü bir inhibisyon gösterdiğini tespit etmiştir.

Disk-difüzyon yöntemi ile yapılan bir çalışmada (Babacan ve ark., 2012), mercanköşk ekstraktı ihtiva eden disklerin *Salmonella* Enteritidis ihtiva eden plaklarda 19 mm'lik zonlar oluşturduğu saptanmıştır.

Bütün bu çalışmalardan anlaşılacağı gibi mercanköşk bitkisinin antibakteriyel aktivitesi bulunmaktadır. Bu çalışmalarda daha çok mercanköşkün farklı türlerinin esansiyel yağları izole edilmiş ve bunlar mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. Bizim çalışmamızda bu bitkinin değişik çözgenlerle hazırlanmış ekstraktları kullanılarak farklı bakteri gruplarına karşı olan antibakteriyel etki tespit edilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, mercanköşk bitkisinin farklı düzeylerde antibakteriyel etkiye sahip olduğu yaptığımız çalışmayla ortaya konulmuştur. Bu ekstraktların gıda ortamında denenmesi araştırmalara açık bir konu olarak karşımızda durmaktadır.

Kaynaklar

Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 15, Ankara.

Akgül, A., Kıvanç, M., Bayrak, A., 1989. Chemical composition and antimicrobial effect of Turkish laurel leaf oil. Journal of Essential Oil Research 1, 277-280.

Aliğianis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, B., 2001. Composition and antimicrobial

activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49, 4168-4170.

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) 75007 Paris France, 190 pp, ISBN 2738000428.

Aydın, B.D., (2008). Bazı bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 14 (1):83-87.

Aydın, S., Öztürk, Y., Başer, K.H.C., 1993. Ege yöresinde yetişen *Origanum onites* L. (İzmir Kekigi) üzerinde etnofarmakolojik araştırmalar. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, İzmir, (20-22 Mayıs).

Babacan, O., Cengiz, S., Akan, M., 2012. Oregano bitkisinin bazı *Salmonella* serotipleri üzerine antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 59, 103-106.

Başer, K.H.C., 2001. Her derde deva bir bitki kekik. Bilim ve Teknik Dergisi Mayıs, 74-77.

Baytop, T., 1984. Türkiye bitkileri ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3255 Eczacılık Fakültesi No: 40.

Benjilali, B., Tantadui-Elaraki, A., Ayadi, A., Ihlal, M., 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six moroccan essences. Journal of Food Protection 47, 748-752.

Burt, S.A., Reinders, S., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology 36, 162-167.

Cingi, M. I., Kirimer, N., Sarikardasoglu, I., Cingi, C., Baser, K.H.C., 1991. *Orianum onites* ve *O. minutiflorum* uçucu yağının farmakolojik etkileri. IX Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.

Collins, C.M., Lyne, P.M., 1987. Microbiological Methods. Butterworths&Co (publishers) Ltd. London 450 pp.

Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and East Aegean Island. Vol. 7, Edinburg University Pres, Edinburg, 297-313.

Deans, S.G., Soboda, K.P., 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. Flavour and Fragrance Journal 5, 187-190.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88, 308-316.

Eloff, J.N., 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? Journal of Ethnopharmacology 60: 1-8.

Farnsworth, N.R., Akerev, O., Bingel, A.S., 1985. The Bulletin of WHO, 63: 9865-9871.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, V., 1989. Antimicrobial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research 1, 119-128.

Lin, Y.T., Labbe, R.G., Shetty, K., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat system by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and Environmental Microbiology 70 (9): 5672-5678.

Lisin, G., Safiyev, S., Craker, L.E., 1999. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils. Acta Horticulturae (ISHS) 501:283-288.

Pauli, A., Knobloch, K., 1987. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi. International Journal of Food Research and Technology 185, 10-13.

Quinin, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Pub., Spain, Year Book Europe Ltd ISBN 07234 17113.

Sağdıç, O., Özcan, M., 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control 14, 141-143.

Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D., 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology 65, 71-77.

Ultee, A., Bennik, J.H.M., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 68, 1561-1568.

Vanderbank, H., 1949. Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie 4: 198-207.

Verastegui, M.A., Sanchez, C.A., Heredia, N.L., Garcia Alvarado, J.S., 1996. Antimicrobial activity of extracts three major plants From the Chihuahuan desert. Journal of Ethnopharmacology 52: 175177.

Zaika, L.L., 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety* 9, 97-118.

Zaika, L.L., Kissinger, J.C., Wasserman, A.E., 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *Journal of Food Science* 48, 1455-1459.

Hypo-versus Hyper-thyroidism in 2 Cats: The Culprit for Military Dermatitis/Hypersensitivity Versus Growth Retardation

Hipotiroidizme karşı hipertiroidizm: İki kedide büyüme geriliğine karşı miliyer dermatitis/hipersensitivite

Songül ERDOĞAN¹ , Kerem URAL¹ , Hasan ERDOĞAN¹ 

¹Aydın Adnan Meneres University, Faculty of Veterinary, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey

Abstract: In the present case series 2 different cats with diagnosis of hypo- versus hyper-thyroidism with distinct clinical signs were reported. The first case was a 3-month-old male domestic short-hair kitten was presented with a disproportionate dwarfism. Radiographic examination of the long bones revealed epiphyseal dysgenesis and delayed epiphyseal ossification. Congenital primary hypothyroidism was established by low serum total thyroxine and initial treatment composed of levothyroxine. The second case was referred to the clinic with unresolved dermatological problems. On referral alopecia, extensive crusting and matting of the haircoat were evident. Hyperthyroidism and related military dermatitis was detected based on elevated serum total thyroxine and free T4 levels along with skin punch biopsy results. Therapeutical armamentarium composed of methimazole and hyperimmune milk factor. In conclusion, early recognition, diagnosis and treatment caused to intervention all resulted in clinical remission and relief of clinical signs accompanied by normal thyroidal function and laboratory results in both cats.

Keywords: Cat, Dermatitis, Dwarfism, Hypothyroidism, Hyperthyroidism.

Öz: Bu olgu sunumunda iki farklı kedide karşılaşılan hipotiroidizme karşı hipertiroidizm ilişkili farklı klinik bulgular sunuldu. İlk olgumuz 3 aylık yaşta, erkek, short-hair ırkı yavru kedi olup cücelik şikayeti ile kliniğimize getirilmiştir. Radyografik bulgularında uzun kemiklerde epifizyal disgenenez ve epifizyal kemikleşmede gecikme tespit edildi. Kongenital hipotiroidizm tanısı düşük total tiroksin seviyesiyle desteklendi ve levotiroksin ile sağaltıma başlandı. İkinci olgumuz ise sağaltıma rağmen düzelmeyen dermatolojik bulgular ile kliniğimize başvurdu. Klinik muayenede alopesi, yaygın kabuklanma ve kıl örtüsünde matlaşma görüldü. Deriden alınan punç biyopsi sonuçları, artan serum total tiroksin ve serbest T4 ve ilişkili miliyer dermatitis ile hipertiroidizm tanısı konuldu. Bu olgumuzda metimazol ve hiperimmun süt faktörü başlandı. Sonuç olarak her iki olgumuzda da erken tanı ve sağaltım ilişkili klinik bulguların giderilmesine, laboratuvar sonuçlarına göre normal tiroid fonksiyonlarına kavuşmalarına yol açtı.

Anahtar Kelimeler: Cücelik, Dermatitis, Hipotiroidizm, Hipertiroidizm, Kedi.

*Corresponding author : Songül ERDOĞAN
Geliş tarihi / Received : 04.12.2019

e-mail : songultp.09@gmail.com
Kabul tarihi / Accepted: 16.12.2019

Introduction

Hyperthyroidism, one of the most frequent endocrine disorder in middle to older aged cats (Peterson, 1986; Feldman and Nelson, 1996; Hibbert, 2018), denote excessive production of thyroid hormones due to abnormally functioning thyroidal tissue (Volckaert et al., 2016a). The incidence of hyperthyroidism in cats has been elevated since it was recognized. Regarding

hyperthyroid cats, solely 5% of are younger than 10 years of age during initial diagnosis (Mooney, 2010; McLean et al., 2014; Stephens et al., 2014; Scott-Moncrieff, 2015).

Congenital hypothyroidism in cats is a rare disorder resulting with disproportionate dwarfism (Scott-Moncrieff, 2007; Johnson and Watson,

2010). Diseased kittens characteristically present short skull and limbs, spine, block-like trunks (Arnold et al., 1984; Crowe, 2004; Scott-Moncrieff, 2007; Szabo and Wells, 2007; Lim et al., 2014). Growth retardation, altered mental status, neuromuscular deficits, retention of hair coat, and other relevant signs might be detected in hypothyroid kittens (Feldman and Nelson, 2004; Scott-Moncrieff 2007; Szabo and Wells, 2007; Pettigrew et al., 2007; Johnson and Watson, 2010; Quante et al., 2010; Bojanic et al., 2011).

Two articles indicated the importance of hyperthyroidism among cats i.e. part I (anatomy, physiology, diagnosis and imaging) (Volckaert et al., 2016a) and part II (scintigraphic diagnosis and relevant treatment (Volckaert et al., 2016b), which prompted the present authors to publish the case series herein. Furthermore the present author's interest was also aroused following receipt of two different cats, 1 with hypo- and the other with

hyper-thyroidism with specific clinical findings and treatment.

Case Report

Case I: hypothyroidic cat

Initial examination revealed disproportional short legs and abducted elbows. As being informed by the owner the cat was obstipated and anorectic. Facial structure of the cat resembled that of a very small aged kitten, although at time of referral it was 3 months of age (Figure 1). It was also interesting that the cat was mentally dull, with very slow respond to stimuli. The owner also informed that the cat was not playing with toys or its brother belonging to the same litter. The cat was 0.78 kg, even if a normal weight for a domestic shorthair kitten of that age must be around or above 2 kg.



Figure 1. a) Hypothyroidic cat b) Hypothyroidic cat shown on the right along with her brother which was born on the same litter. Both cats were 3 months of age, whereas the present case was lethargic, showed failure to growth. c) both normal and hypothyroidic cats shown at 7 months of age (2 months of methimazole treatment).

Serum total T4 levels were lower than the reference ranges (0.5 µg/dL; reference range 0.8-4.7µg/dL). Fecal examination was negative and not deemed any parasite. Beside antiparasitic medication was available previously. The cat was prescribed for levothyroxine (0.05 mg q 12 h orally), lactulose (1.5 mL q 8 h orally) along with warm water enema, as was also described previously (Traas et al., 2008).

Case II: cat with hyperthyroidism

The first case was referred to the clinic with unresolved dermatological lesions [(miliary dermatitis, erythema, erosion and crusting) (Figure 2)]. As being informed by the owner the cat was hypersensitive and referred to several Veterinary Clinics with varying duration of diarrhea, unresponsive to traditional treatment. Up to date there was no precise diagnosis nor thyroidal profile was analyzed. On initial referral the cat was overactive, aggressive, with evidence of

tachyarrhythmia (210 bpm). Miliary dermatitis, erythema and crusting were detected on rear legs, lumbal area. Serum biochemistry, endocrine

profile, anti-nuclear antibody test were all performed (Table 1).



Figure 2. Miliary dermatitis along with severe crusting and erythema. Photographic record was taken on at a) initial examination and b) 2 months of therapy including methimazole and hyperimmune milk factor.

Table 1. Thyroidal panel in two different cats; Case I: Cat with hypothyroidism and case II: Cat with hyperthyroidism.

Parameters	Case I		Case II	
	day 0	day 70	day 0	day 70
Total T4 (ug/dL)	0.5	2.8	11.9	2.6
Free T4 (pmol/L)	0.77	2.1	21.4	39.5
Total T3 (ng/mL)	0.5		0.92	-
Plasma cortisole (ug/dL)	5.2		-	256
Growth hormone	0.8	2.5	-	-
SomatomedinC(IGF-1)	80.2	467	-	-
Clinical findings	F.g., H.in		Di, Tachy., Wl	
Available data	T.p., S.b., E.p.		T.p., S.b., P.biop.	

Di: diarrhea, Tachy: tachycardia, Wl: weight loss, F.g.: failure of growth, H.in: heat intolerance, T.p.: thyroid panel, S.b.: serum biochemistry, P.biop.: punch biopsy, E.p.: endocrin panel (plasma cortisole)

For treatment, methimazole (2,5 mg/cat) and hyperimmune milk factor were applied during two months. Before treatment regime skin punch biopsy (6 mm) was performed. For this, local anesthesia with 0, 3 ml lidocaine 2% was injected by subcutaneously surrounding the selected lesion. After anesthesia, biopsy punch was placed on selected area and observed biopsy samples was transferred to %10 formalin.

Discussion

In the vast majority of cats with hyperthyroidism weight loss, hyperactivity, increased body temperature, diarrhea, cardiovascular problems

(tachycardia or other relevant arrhythmias, systolic murmurs, hypertrophic cardiomyopathy, tachypnea, dyspnea), altered behavior, stress intolerance, muscle weakness/ atrophy, hair coat changes, polyuria/polydipsia, systemic hypertension, polyphagia, vomiting, increased frequency of defecation (Bucknell, 2000; Mooney, 2010; Klein, 2012; Peterson, 2014; Scott-Moncrieff, 2015). The atypical form of hyperthyroidism, also known as apathetic or masked hyperthyroidism, is associated with signs of depression and anorexia, often still accompanied by weight loss. It is important to keep in mind that not all hyperthyroid patients demonstrate the typical clinical presentation and

signs may be subtle, especially in early stages (Bucknell, 2000). Some of hyperthyroid cats present excessive grooming behavior causing alopecia or crusty rash, accompanied with intense itching resembling miliary dermatitis (Peterson, 2012). The latter condition might be in relation with with an underlying allergy, whereas dermatological alterations could reflect cat's obsessive and compulsive behavior (i.e. elevated licking and grooming) (Peterson, 2011). In one of the present cases herein reported clinical signs mimicking hyperthyroidism were diarrhea, tachycardia and weight loss. Besides striking and interesting clinical feature was miliary dermatitis in which should be on the list of differential diagnosis for hyperthyroidism (Peterson, 2011).

Hyperimmune milk factor (microlactin) was the drug of choice for relieving hypersensitivity and miliary dermatitis in case I of this article. Regarding the efficacy of microlactin; it inhibits and reverses neutrophil attachment to the blood vessel wall-stabilizing inactivated neutrophils unable to participate in inflammation (Beck and Fuhrer, 1993; Okubo et al., 2016). Furthermore it is able to maintain proper actioning of another inflammatory cell, macrophages with proven *in vitro* and *in vivo* effects (Gingerich and Strobel, 2003; Bello and Allen, 2005). Taking into account crusting dermatosis in cats, small circumscribed crusts of feline dermatitis might be found, in which the most commonly observed allergic dermatitis is flea allergy (Carlotti, 2004). There might be also crusts related to excoriations located on to the dorsolumbar area (Carlotti, 2004), which was similar to the case I in this article. Feline eosinophilic plaque (Gross et al., 1986) and miliary dermatitis (Carlotti, 2004) both mimic clinical findings of allergic skin disease, in which dermal inflammation composed of eosinophils, mast cells, lymphocytes and neutrophils (Gross et al., 2005). In the present case with hyperthyroidism, 6 mm skin punch biopsy was performed prior to treatment application, in which histopathology revealed mixed inflammatory infiltrate reach in mast cells along with erosion and ulceration.

Therefore, it may be safely suggested that microlactin may have helped clinical recovery and relieving inflammation.

Taking into account growth failure in cats and dogs, related endocrine causes are GH/IGF-1 deficiency, excessive glucocorticoids, hypothyroidism, hypoadrenocorticism, diabetes mellitus and vitamin D disorders (Scott-Moncrieff, 2015). In the present case with hypothyroidism diagnosis was based on low levels of total T4 and fT4, along with normal blood glucose, cortisol and vitamin D levels. Besides early recognition of the disease and effective levothyroxine treatment all resulted in growth of the kitten, which supported precise/tentative diagnosis.

In conclusion the good (well prognosis and respond to treatment), the bad (the clinical signs) and the ugly (serum biomarkers i.e. endocrine profile) parts of two distinct thyroidal disorders; hypo- vs. hyper- thyroidism have been documented herein at the same time. Early recognition, real time diagnosis within the necessary biomarkers and prompt treatment might overcome thyroidal diseases among cats.

References

- Arnold, U., Opitz, M., Grosser, I., Bader, R., Eigenmann, J.E., 1984.** Goitrous hypothyroidism and dwarfism in a kitten. *Journal of the American Animal Hospital Association* 20, 753–758.
- Beck, L.R., Fuhrer, J.P., 1993.** Milk lymphocyte anti-adhesion factor, and its role as an anti-microbial. In: *International Dairy Federation, Uppsala, Sweden*, 62-72.
- Bello, T.R., Allen, T., 2005.** The Use of MicroLactin® for Inflammatory Conditions in Equine Veterinary. *Journal of Equine Veterinary Science* 25(9), 380-382.
- Bojanic, K., Acke, E., Jones, B.R., 2011.** Congenital hypothyroidism of dogs and cats: A review. *New Zealand Veterinary Journal* 59, 115–122.
- Bucknell, D.G., 2000.** Feline hyperthyroidism: spectrum of clinical presentations and response to carbimazole therapy. *Australian Veterinary Journal* 78,

462 – 465.

Carlotti, D.N., 2004. Crusting Dermatoses in Cats. In: World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, Cabinet de Dermatologie Vétérinaire, Heliopolis B 3 Bordeaux-Mérignac, France.

Crowe, A., 2004. Congenital hypothyroidism in a cat. Canadian Veterinary Journal 45, 168–170.

Feldman, E.C., Nelson, R.W., 1996. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. WB Saunders, Philadelphia.

Feldman, E.C., Nelson, R.W., 2004. Feline hypothyroidism. In: Feldman, E.C., Nelson, R.W., (Eds.), Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 143–151.

Gingerich, D.A., Strobel, J.D., 2003. Use of client-specific outcome measures to assess treatment effects in geriatric, arthritic dogs: controlled clinical evaluation of a nutraceutical. Veterinary Therapeutics 4(1), 56-66.

Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J., Affolter, V.K., 2005. Spongiotic and vesicular diseases of the epidermis. Feline eosinophilic plaque. In: Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J., Affolter, V.K., (Eds.), Skin Diseases of the dog and cat. Clinical and histopathological diagnosis. Blackwell Science, USA, pp. 105-115.

Gross, T.L., Kwochka, K.W., Kunkle, G.A., 1986. Correlation of histologic and immunologic findings in cats with miliary dermatitis. Journal of the American Veterinary Medical Association 189, 1322-1325.

Hibbert, A., 2018. Common feline enteropathies: a case based approach. In: BSAVA Congress Proceedings, BSAVA Library, pp. 71-72.

Johnson, K.A., Watson, A.D.J., 2010. Skeletal diseases. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C., (Eds.), Textbook of Veterinary Internal Medicine. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 819–845.

Klein, B.G., 2012. Endocrine glands and their function. In: Klein, B.G., (Eds.), Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 428 – 464.

Lim, C.K., Rosa, C.T., De Witt, Y., Schoeman, J.P., 2014. Congenital hypothyroidism and concurrent renal insufficiency in a kitten. Journal of the South African Veterinary Association 85(1), 6.

McLean, J.L., Lobetti, R.G., Schoeman, J.P., 2014. World- wide prevalence and risk factors for feline hyperthyroidism: a review. Journal of the South African Veterinary Association 85, 1097.

Mooney, C.T., 2010. Hyperthyroidism. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C., (Eds.), Textbook of Veterinary Internal Medicine. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 1761 – 1779.

Okubo, K., Kamiya, M., Urano, Y., Nishi, H., Herter, J. M., Mayadas, T., Kurosawa, M., 2016. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. EBio Medicine, 10, 204-215.

Peterson, M.E., 1986. Hyperthyroidism in cats. In: Chastain, C.B., Ganjam, V.K., (Eds.), Clinical endocrinology of companion animals. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 110-175.

Peterson, M.E., 2011. Top 10 Signs of Hyperthyroidism Top 10 Signs of Hyperthyroidism in Cats.
<http://www.animalendocrine.info/2011/05/top-10-signs-of-hyperthyroidism-in-cats.html> (Access Date: 24.11.2019).

Peterson, M.E., 2014. Feline hyperthyroidism: an animal model for toxic nodular goiter. Journal of Endocrinology 223, 97-114.

Pettigrew, R., Fyfe, J.C., Gregory, B.L., Lipsitz, D., Delahunta, A., Summers, B.A., Shelton, G.D., 2007. CNS hypomyelination in Rat Terrier dogs with congenital goiter and a mutation in the thyroid peroxidase gene. Veterinary Pathology 44, 50–6.

Quante, S., Fracassi, F., Gorgas, D., Kircher, P.R., Boretti, F.S., Ohlerth, S., 2010. Congenital hypothyroidism in a kitten resulting in decreased IGF-1 concentration and abnormal liver function tests. Journal of Feline Medicine and Surgery 12, 487–490.

Scott-Moncrieff, J.C., 2007. Clinical signs and current diseases of hypothyroidism in dogs and cats. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 37, 709–722.

Scott-Moncrieff, J.C., 2015. Feline hyperthyroidism. In: Feldman, E.C., Nelson, R.W., Reusch, C., Scott-Moncrieff, J.C., Behrend, E., (Eds.), Canine and Feline Endocrinology. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 136 – 195.

Stephens, M.J., O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C., 2014. Feline hyper- thyroidism reported in primary-care

veterinary practices in England: prevalence, associated factors and spatial distribution. *Veterinary Record* 175, 458.

Szabo, S.D., Wells, K.L., 2007. What is your diagnosis?. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230, 29–30.

Traas, A.M., Abbott, B.L., French, A., Giger. U., 2008. Congenital Thyroid Hypoplasia and Seizures in 2 Littermate Kittens. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22(6), 1427-1431.

Volckaert, V., Vandermeulen, E., Daminet, S., Saunders, J., Peremans, K., 2016a. Hyperthyroidism in cats, part I: anatomy, physiology, pathophysiology, diagnosis and imaging. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 85(5), 255-264.

Volckaert, V., Vandermeulen, E., Daminet, S., Saunders, J., Peremans, K., 2016b. Hyperthyroidism in cats, part II: scintigraphic diagnosis and radioiodine treatment. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 85(5), 265-273.