



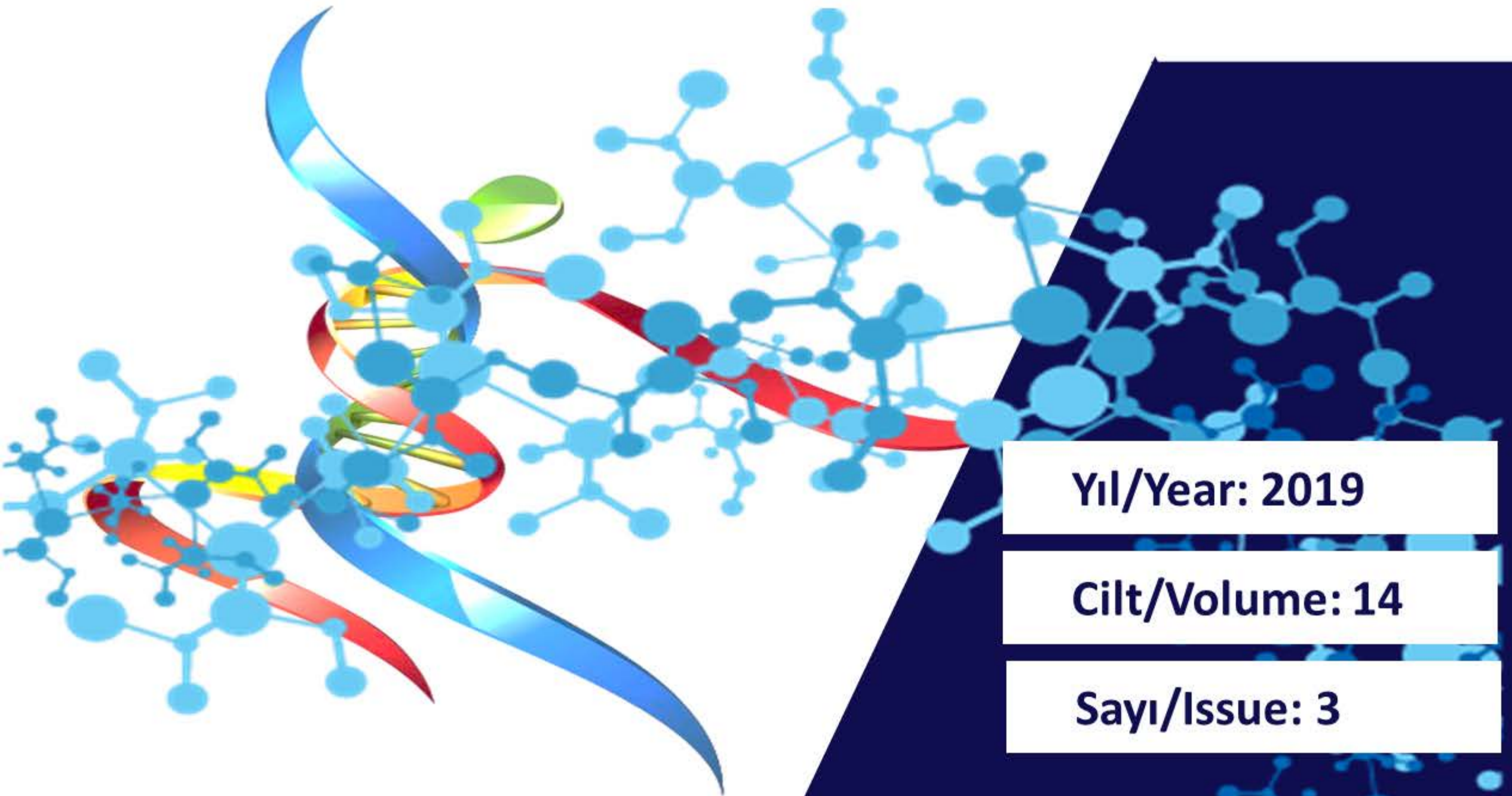
ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Veteriner Bilimleri Dergisi

ATATÜRK UNIVERSITY

Journal of Veterinary Sciences



Yıl/Year: 2019

Cilt/Volume: 14

Sayı/Issue: 3

ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

**Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi**

**Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences**

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd>

Aralık/December

Yıl/ Year: 2019

Cilt/Volume: 14

Sayı/Issue: 3



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ
ISSN: 1306 – 6137 / e-ISSN: 2147 – 9615
ATATÜRK UNIVERSITY
JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ADINA SAHİBİ / OWNER

Prof. Dr. Hamza AVCIOĞLU

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Baş Editör / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Prof. Dr. Ekrem LAÇIN
(İstatistik Editörü / *Statistics Editor*)

Doç. Dr. Latif Emrah YANMAZ
(Yabancı Dil Editörü / *English Editor*)

Doç. Dr. Serkan YILDIRIM
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

Doç. Dr. Hakan AYDIN
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

Doç. Dr. Emin ŞENGÜL
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

Doç. Dr. Serdar ALTUN
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

Dr. Öğr. Üyesi Murat GENÇ
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL
(Bölüm Editörü / *Section Editor*)

YAYIN KURULU ÜYELERİ / EDITORIAL BOARD MEMBERS

Dr. Mustafa Atasever, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Zekai Halıcı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Mustafa Alişarlı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Ardita Jahja-Hoxha, KOSOVA / KOSOVO

Dr. Aleksandra Gorecka-Bruzda, POLONYA / POLAND

Dr. Daniel Zahner, ALMANYA / GERMANY

Dr. Eva Voslarova, ÇEK CUMHURİYETİ / CZECH REPUBLIC

Dr. Tanvir Rahman, BANGLADEŞ / BANGLADESH

Sekreteryaya ve Web Tasarım *Secretariat and Web Design*

Doç. Dr. Serdar ALTUN

Dizgi *Typesetter*

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., ulusal hakemli bir dergi olup Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Bu dergi, **ELSEVIER-Scopus**, **CAB Abstract**, **CABI full text**, **EBSCO**, **TÜBİTAK-ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veritabanı** ve **Türkiye Atıf Dizini** tarafından taranmaktadır.

Atatürk University J. Vet. Sci., is a refereed national journal, is published tri-annually in April, October and December. This journal is abstracted in **ELSEVIER-Scopus**, **CAB Abstract**, **CABI full text**, **EBSCO**, **TUBİTAKULAKBİM-Life Science Database** and **Türkiye Citation Index**.

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü, 25240, Kampüs Erzurum / TÜRKİYE

Tel : +90 442 2317222, Fax: +90 442 2317244

E-posta: atavetderg@atauni.edu.tr; vetdergisi@atauni.edu.tr

Yıl / Year: 2019

Cilt / Volume: 14

Sayı / Issue : 3

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 2019; 14(3)

Bu Sayının Hakem ve Danışman Listesi / List of Referees and Advisors for This Issue

- Prof. Dr. Armağan ÇOLAK, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Ayhan ATA, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Burdur, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Barış SARI, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Samsun, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Kamil BEŞOLUK, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mehmet GÜL, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Sait ŞENDAĞ, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Sena ÇENESİZ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Samsun, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Sulhaddin YAŞAR, Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Iğdır, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Şükrü Hakan ATALGIN, Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Balıkesir, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Şaziye Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Ünal KILIÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Samsun, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Zahid Tefvik AĞAOĞLU, Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sivas, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Emrah Hicazi AKSU, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Erhan ÖZENÇ, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. İbrahim YURDAKUL, Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sivas, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Mustafa KÖM, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Özgür KAYNAR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Semra KAYA, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Seyda CENGİZ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Ali TAGHIZADEHGHAEHJOUGHİ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARAKUŞ, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Emre ARSLANBAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Nergis ULAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Özgül GÜLAYDIN, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Saadet BELHAN, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Serkan EROL, Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kastamonu, TÜRKİYE.

* Hakem listesi akademik unvan ve isme göre alfabetik olarak sıralanmıştır.

▶ Artina PRASTIWI, Zafer OKUMUŞ, Armağan HAYIRLI, Demet ÇELEBİ, Latif Emrah YANMAZ, Elif DOĞAN, Mümin Gökhan ŞENOCAK, Uğur ERSOZ. Effectiveness of Copper Sulfate Solutions in Footbaths in Dairy Cattle (<i>Süt Sığırları Ayak Banyolarında Bakır Sülfat Solüsyonlarının Etkinliği</i>).	238-245
▶ Saadet BELHAN, Gökhan OTO, Okan ARIHAN, Volkan KOŞAL. Changes in Sperm Parameters Following Administration of Theophylline, a Competitive Antagonist of Adenosine in Rats Exposed to Bleomycin, a Chemotherapeutic Agent (<i>Bir Kemoterapotik Ajan Olan Bleomisine Maruz Kalan Ratlarda Adenozinin Kompetitif Antagonisti Olan Teofilinin Uygulanması Sonrasında Sperm Parametrelerindeki Değişimler</i>).	246-251
▶ Mohammad ALHILAL, Suzan ALHILAL, Thana ALBAZ. The Effects of Borage Oil on Hyperlipidemic Diet-induced Liver Damage in Male Golden Syrian Hamsters (<i>Altın Suriye Hamsterlarında Hiperlipidemik Diyet ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Hodan Yağının Etkileri</i>).	252-262
▶ Mian Nazir SHAH, Aamir IQBAL, Muhammad RIAZ, Samiullah KHAN, Muhammad Tahir KHAN, Abdur Rahman SIAL, Ismail BAYRAM. Effect of Graded Supplementation Levels of Golden Chain Tree (<i>Cassia Fistula L.</i>) Leaves on Feed Intake, Nutrients Digestibility and Plasma Lipids Profile in Growing Rabbits (<i>Büyüme Dönemindeki Tavşan Rasyonlarına Farklı Oranlarda Altın Zincir Ağacı (Cassia Fistula L.) Yaprakları İlavasının Yem Tüketimi, Besin Maddesi Sindirilebilirliği ve Plazma Lipit Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması</i>).	263-272
▶ Lotfi MOUSSOUNI, Omar BESSEBOUA, Abdelhanine AYAD. Anthelmintic Activity of Aqueous and Ethanol Extracts of <i>Urtica dioica L.</i> and <i>Myrtus communis L.</i> Leaves on Bovine Digestive Strongyles: In-Vitro Study (<i>Urtica dioica L. ve Myrtus communis L. Yapraklarının Sulu ve Etanolik Ekstraktlarının Sığır Sindirim Strongilozu Üzerine Antelmintik Aktivitesi: In-vitro Çalışma</i>).	273-283
▶ Caner BAYRAM, Derviş ÖZDEMİR. Karatavukta (<i>Turdus merula</i>) Neurocranium'un Makro-Anatomik Olarak İncelenmesi (<i>Macro-Anatomical Examination of the Neurocranium in The Blackbird (Turdus merula)</i>).	284-289
▶ Nuket KAMIŞ, Funda KARABAĞ ÇOBAN. Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması (<i>D Investigation of Caffeic Acid Phenethyl Ester Effect on Inflammation and Oxidative Stress in Paracetamol Induced Hepatotoxicity</i>).	290-298
▶ Deniz YENİ, Fatih AVDATEK, Mustafa GÜNDOĞAN. Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi (<i>The Effect of Different Concentrations of Bovine Serum Albumin on Sperm Quality and DNA Damage in Short Term Stored Ram Semen</i>).	299-306
▶ Yasemin KAPLAN, Nihat ÖZYURLU, Mehmet KÖSE, Mehmet Osman ATLI, İbrahim KÜÇÜKASLAN, Mesut KIRBAŞ. Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profiline Belirlenmesi (<i>Detection of Plasma Profile of Pregnancy Associated Glycoproteins During Early Pregnancy in Pregnant Konya Merino Sheep</i>).	307-314
▶ Şaziye Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ, Büşra DUMLU, Royale AHMADOVA. Katıfaz Fermentasyonu ile Arpanın Besin Değerinin İyileştirilmesi (<i>Improving the Nutritional Value of Barley by Solid State Fermentation</i>).	315-323
▶ Murat Alper ÜRE, Fatih BÜYÜK. Kars Yöresinde Kazlarda <i>Salmonella</i> Enteritidis Antikorlarının ELISA ile Araştırılması (<i>Investigation of Salmonella Enteritidis Antibodies in Geese in Kars Province by ELISA</i>).	324-329
Olgu Sunumu/Case Report	
▶ Aynur DEMİR, Gülşen Sevim KARAGÖZÖĞLU, Burcu Ezgi EREGAR. Anterior Uveitis and Aqueous Lipidose Associated with Hyperlipidemia in Two Cats (<i>İki Kedide Hiperlipidemi ile İlişkili Anterior Üveit ve Aköz Lipidozis</i>).	330-334
Derlemeler / Reviews	
▶ Alisa SMAJOVIĆ, Muhamed KATICA, Davorka ZAVRŠNIK, Elma VELJOVIĆ, Kenan ČAKLOVICA. Application of Xanten and Its Derivatives in Human and Veterinary Medicine (<i>Xanten ve Türevlerinin İnsan ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı</i>).	335-342
▶ Süleyman KOZAT. Yenidoğan Buzagalarda Kolostrum Yönetiminin Önemi (<i>The Importance of Colostrum Management in Newborn Calves</i>).	343-353
▶ Damla Tuğçe OKUR, Bülent POLAT. İneklerde Anöstrus: Nedenleri ve Sınıflandırılması (<i>Anoestrus in Cows: Causes and Classification</i>).	354-361



Effectiveness of Copper Sulfate for Footbath Solutions in Dairy Cattle

Artina PRASTIWI^{1a}, Zafer OKUMUŞ^{1b}, Armağan HAYIRLI^{2c}, Demet ÇELEBİ^{3d},
Latif Emrah YANMAZ^{1e}, Elif DOĞAN^{4f}, Mümin Gökhan ŞENOCAK^{1g}, Uğur ERSOZ^{1h}

1. Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, Erzurum, TURKEY.
2. Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Erzurum, TURKEY.
3. Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Erzurum, TURKEY.
4. Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, Kastamonu, TURKEY.
ORCID: 0000-0002-5886-5459^a, 0000-0002-7525-9725^b, 0000-0002-4446-0848^c, 0000-0002-2355-0561^d, 0000-0001-5890-8271^e, 0000-0002-3321-8116^f, 0000-0002-8855-8847^g, 0000-0002-1687-2327^h

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.03.2019	18.07.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Prastiwı A, Okumuş Z, Hayırlı A, Çelebi D, Yanmaz LE, Doğan E, Şenocak MG, Ersoz U: Effectiveness of Copper Sulfate Solutions in Footbaths in Dairy Cattle. Atatürk University J. Vet. Sci., 14(3): 238-245, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.538342

Abstract: The aim of this study was to identify the loss of antiseptic effect of copper sulfate (CuSO₄) if associated with the number of cow passing in footbath. A total of 360 Holstein and Simmental cows were milked three times daily in 2x12 herringbone milking parlor. After 360 cows passing from footbath (220x90x15 cm) containing 0%, 2% and 4% CuSO₄, the sample was collected for pH and microbiology. The loss of antiseptic effectiveness was considered when pH more than 5. The mean pH at the end of 15 passages of cows was 8.13, 5.00, and 4.20 for 0%, 2% and 4% CuSO₄ solutions. pH was greater than 5.0 after 7 passages of 24-cows in 2% CuSO₄ concentration and did not exceed 5 even after 15 passages in 4% CuSO₄ concentration. Change in color was correlated with pH. Samples were incubated for 24-72 hours for bacterial and fungal growth. *E.coli* was present at control group of CuSO₄ concentrations, whereas fungus was not present. In conclusion, increasing pH due to the number of cow passing indicated the effectiveness of CuSO₄ in footbath was lost. Antiseptic effect in 2% CuSO₄ solution was lost after 168 cows passing through footbath, whereas antiseptic effect in 4% CuSO₄ solution lost after 360 cows passing through footbath.

Keywords: Copper sulfate, Dairy cow, *Escherichia coli*, Footbath, pH.

Süt Sığırları Ayak Banyolarında Bakır Sülfat Solüsyonlarının Etkinliği

Öz: Bu çalışmanın amacı, bakır sülfatının (CuSO₄) etkisinin ayak banyosunda geçen sığır sayısına bağlı olup olmadığını saptamaktır. Çalışmanın gerçekleştirildiği sağmal işletmede; Holştayn ve Simmental ırkı 360 baş inek, 24'lü sağım ünitesinde 15 ayrı grup şeklinde günde üç defa sağıldılar. Hayvanların tamamı, %0, %2 ve %4 CuSO₄ içeren ayak banyosundan (220x90x15cm) geçirildi. Antiseptik ayak banyosundan 24 hayvan geçtikçe, banyo sıvısından örnek alındı. Biriktirilen örnekler pH ve mikrobiyolojik yönden incelendi. pH>5 olan ayak banyolarındaki kimyasalların antiseptik özelliğini kaybettiği belirlendi. İçlerinden 360 hayvan geçtikten sonra geride kalan %0, %2 ve %4 bakır sülfat solüsyonlarının pH ortalaması sırasıyla 8.13, 5.00 ve 4.20 olarak bulundu. %2 CuSO₄ solüsyonundan 7.gruptaki hayvanlar geçtikten sonra ortalama pH değeri 5'den yüksek bulunurken, %4'lük CuSO₄ solüsyonundan 15.gruptaki hayvanlar geçtikten sonra ortalama pH değeri 5'ten düşük olduğu saptandı. Ayak banyosunun renginin pH değişimi ile ilgili olduğu belirlendi. Örnekler bakteri ve mantar gelişimi için 24-72 saat inkübe edildi. Kontrol grup CuSO₄ solüsyonlarında *E.coli* bulunurken, yapılan mantar incelemesinde hiç bir grupta herhangi bir üremeye rastlanmadı. Sonuç olarak; pH değerinin ayak banyosundan kaç hayvan geçtiği ile ilişkili olduğu saptandı. %2'lik CuSO₄ konsantrasyonundan 168 hayvan, %4'lük konsantrasyonundan 360 hayvan geçtikten sonra antiseptik etkinliğini kaybettiği belirlendi.

Anhtar Kelimeler: Ayak banyosu, Bakır sülfat, *Escherichia coli*, pH, Süt sığırları.

✉ Artina Prastiwı

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, Erzurum, TURKEY.
e-mail: prastiwıartina@gmail.com

INTRODUCTION

Lameness and foot-related problems are major concern in the dairy industries because of their common occurrence and causes lost milk production (1,2,3). Cattle lameness is a leading cause of welfare and the productivity in dairy farming (4,5,6). Worldwide incidence is reported as high as 26% of all dairy cattle (7,8) with a much higher incidence in high producing dairies in temperate countries. The USA has an incidence 59% and use of footbaths to control hoof diseases because 22% of cows are being affected (9), an incidence of 35%, in Canada 62% in the UK whereas sole ulcers (40%), white line lesions (29%) and digital dermatitis as recognized as the most common lesions on dairy farms in the UK (10) and a staggering 69% in Turkey (1,11).

There are several areas on the farm that can lead to cattle lameness include nutrition (12), feeding management, animal behavior, stress, cow comfort, and infrequent hoof trimming (11). Lesions that cause lameness in dairy cows causes stress, produce severe pain, reduces productivity and are a major animal welfare issue (13,14). According to Cook (12), footbaths are used as a prevention management tool, not a method of treatment for hoof lesions.

Prevention of lameness and other hygiene-related lameness can be avoided with good foot hygiene and footbath management regularly (10,12,15). Footbath treatment programs are used on most dairies as one of the best and most effective means of controlling hoof disease. Use of a footbath in the dairy industry for the control of infectious hoof disease is wide-spread in North America and elsewhere around the world (9,12). Most cattle mobility experts recognise the value of regular footbathing on the dairy farm; preferably on a daily basis or each time the cows are moved to or from the milking area (10,12).

Laven and Logue (7) concluded that there was a lack of scientific evidence regarding the treatment and control diseases with foot baths such that firm recommendations on what products and concentrations to use cannot be made. Many

research reports with multiple foot bathing regimens studies is difficult because each study calculates statistical significance in comparison to other treatment groups within the experiment, and not all used untreated or placebo treated control groups for comparison. Later on, empirical advice for changing footbath solutions every 100 to 300 cows (4,9,10,16) appears to be followed by most farms, but it is challenged on larger dairies and there is very little in the scientific literature to help producers with their decision making (12).

Copper sulfate appears to be the most effective antibacterial agent (5,17,18). Where copper sulfate can be used, it is clearly the first choice antibacterial to be considered (17). Based on research report, copper sulfate footbaths in concentrations 5% and above have been shown to reduce new digital dermatitis lesions compared to untreated controls whilst in concentration 2% and above have been shown to be equivalent in preventing new infections in cows that are already unaffected (2).

A quick search indicates great concern about potential soil toxicity from footbaths using copper sulfate (11). Concentration of copper sulfate should not be higher than 5% as long as pH is not less than 3.0. Copper sulfate appears the most efficacious agent to include in all a footbath program, but disposal concerns should limit the frequency of its use (10,12). Despite an extensive literature search, no reports were found regarding the cow passing number through the footbath in different concentration of CuSO_4 . Previous study only reported 5%-10% CuSO_4 solution allows a median of 200 cows in the herds (9,10,12,16). The current industry rule of thumb is 200 to 300 cow passes before footbaths need to be changed. For producers looking to use less copper sulfate and save money, using less copper sulfate also means less to purchase (9,12).

Therefore, the aim of the present study was to determine the effectiveness of copper sulfate in less concentration to know the maximum number of cow passing through the footbath solution, advice for

changing footbath solutions and reduce soil toxicity. It also was to compare of efficacy a 2% and 4% CuSO₄ copper sulfate footbath solution with negative control in dairy cattle. The use and management of the footbath are critical to the success of the program.

MATERIALS and METHODS

This study was approved by the Ataturk University Faculty of Veterinary Medicine Clinical Research Ethics Committee (AÜVFEAK) No: 2015/5.

Footbath

Footbath used in dairy herds to maintain and control optimum hoof health (9). Foot bathing is considered an essential procedure and should be undertaken on a regular basis (12). The dimensions of footbath were selected approached the recommendation from Cook et al. (9,12) and Shearer and Van Amstel (19); each bath was 2.2 m long, 0.90 wide, and held a fluid depth of 0.15 m, for a combined volume of 225 L. Farm used copper sulfate (CuSO₄), as it is the most common chemical used in footbaths in Turkey (4,5). The concentration of CuSO₄ solutions were 2% and 4%. Data on the Dutpinar farm (360 cows) were collected 3 times a day within 9 days between May and September 2015 by 1 trained observers and the first author.

Clean copper-based footbath solution should be blue-green in color, not brown (5,10,12). Farm used digital pH-meter to check the pH of footbath. An initial footbath should have a pH between 3.5 and 4.5 for optimal results. If pH is above 5.0, the footbath is no longer effective and must be changed (20). The current industry rule of thumb is 200 to 300 cow passes before footbaths need to be changed. This study was to calculate the average number of cow passes per bath by monitoring pH values and color changed. Depending on organic load and environmental conditions, efficiently run footbaths can increase the number of cow passes.

Refreshing and Refilling of Footbath Solution

It is recommended to run a footbath twice a week or more and to refresh solution after every 200 cow passes (4,9). This number is somewhat variable and should be optimized for each farm, taking into account herd size, contamination with organic material and temperatures. The averages below suggest that most dairies in the study are meeting those minimums.

Study Design

The experiment was conducted to test the effectiveness of different concentration footbathing using 2% and 4% CuSO₄ in group of daily cows. Before intervention, no changes were made to the farms' original footbath. Three hundred sixty Holstein and Simmental cows divided into 15 groups, each group consisted of 24 cows and were milked three times daily in 2x12 herringbone milking parlor. During the study, cows walked through allocated footbath solutions after milking on 3 times a day. Samples for pH and microbiological examination were taken after cows passing 0%, 2% and 4% CuSO₄ solutions. The color change and pH more than 5 indicated that antiseptic effect was loss. Data were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures option.

Statistical Analyses

Data were entered into Microsoft Access (Microsoft Corp., Redmond, WA), and statistical analyses were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures option. For all analyses, a P-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Farms and Footbath Practices

Footbath design and footbathing practices before footbath intervention had a median length of 220 cm (range, 183 to 370) and a mean depth of 15 cm (range, 10 to 21). Prewashing cows' feet consist of normal water placed at the exit line after milking process. On average, footbath contents were

replaced every total of 360 cow passes without identify the loss of antiseptic effect of copper sulfate (CuSO_4) in footbath. The farm ($n = 1$) used a chemical (mostly with copper sulfate), and chemical concentration was less than 5% in order to reduce the cost and reduce soil toxicity. Within-herd prevalence of lameness cases was considered low (<10%).

The Color Change

The color of initial sample was light blue, 2nd sample to 13rd sample were changed from light became dark green (Figure 1). Then, color changed up to dark brown until 15th group's sample. Color changed caused by exposure of manure, slurry, and urine in the footbath. Color changed had correlation in increasing pH and decrease the effectiveness of the CuSO_4 solutions. Color change as well as increased pH range indicated footbath solution needs to be recharged.



Figure 1. Color changing of 15 pH samples from footbath.

Şekil 1. Ayak banyosundaki 15 pH örneklerinin renk değişimi.

Bacterial Finding

Microbiological examination result performed *Escherichia coli* as an indicator of footbath

contamination only found at control group. *Escherichia coli* was only found at control group (0% CuSO_4 concentrations), whereas fungus was not present. *Escherichia coli* (abbreviated as *E. coli*) is a type of *bacteria* that normally found in the environment, foods, and intestines of people and animals (15). In that regard, on farm only apparent lameness in low prevalence during intervention.

pH Changing

The mean of initial pH was 7.322, 4.507, 3.643. Mean pH of 7th group were increased to 8.265, 5.000, 4.275. Mean pH of 15th group were 8.240, 5.198, 4.357 for 0%, 2% and 4% CuSO_4 solutions (Figure 2). Footbath solution should be maintained at 3.5-5.5 pH (10, 12). pH was greater than 5.0 after 7 passages of 24-cows when CuSO_4 concentration was 2%. Increasing pH indicated the effectiveness of CuSO_4 was lost and footbath concentration should be changed. pH average at 4% CuSO_4 concentration was did not exceed 5 even after 15 passages of 24-cows. It showed that 4% CuSO_4 concentration could be applied in big herds.

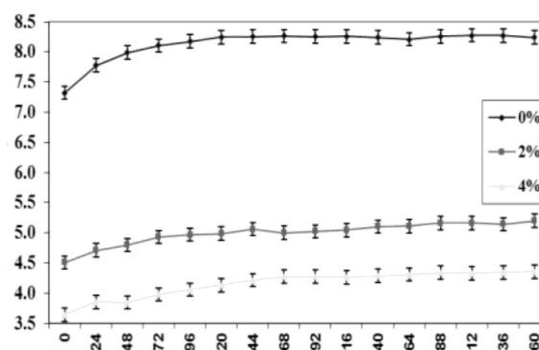


Figure 2. Correlation between cow passes and pH average.

Şekil 2. İnek geçişleri ile pH ortalaması arasındaki korelasyon.

Number of Cow Passes

We concluded that on farm with 2% CuSO_4 solution should be changed after 168 cows passed through the footbath. 2% CuSO_4 solution only recommended in small herd. 4% CuSO_4 solution can be changed after 360 cows have passed though the

footbath. It is suggested to use 4% CuSO₄ concentration in big herds (range 360 to 400 cows). Proper footbath use will make hoof diseases management more effective and save money by reducing the amount of solution used. Ideally, in the future, there would be a bath side test to tell when the solution needs to be changed. The solution can then be directly pumped into the bath. Several

milking machine manufactures have already invested in automated equipment to facilitate footbath mixing in large herds.

Statistical Analysis

There is statistically significant differences (Table 1) in the number of cow passing with group of cows (P=.000).

Table 1. Statistical analysis with pH rate variable.

Tablo 1. pH oranı değişkenli istatistiksel analiz sonuçları.

Variance source	Type III squares sum	SD	Average squares	F	P
Corrected model	766.379 ^a	47	16.306	224.767	,000
Intersection	8876.003	1	8876.003	122350.122	,000
Group	735.992	2	367.996	5072.596	,000
Transition	11.867	15	.791	10.905	,000
Group*Transition	.871	30	.029	.400	,000
Error	16.395	226	.073		,998
Total corrected	9481.355	274			
Total	782.774	273			

Dependent variable = pH level; a. R Squared = .979 (R Squared corrected = .975)

DISCUSSION and CONCLUSION

Question remains regarding the best footbath solution, its concentration and number of passing cows through the footbath. Copper sulfate (CuSO₄), as it is the most common chemical used in footbaths in Turkey, Canada, USA and other countries (2,6,18), most research on footbathing protocols has been conducted on experimental dairy farms (17) with limited sample sizes or with relatively short follow-up periods (18).

In this study, *E.coli* was only present at control group of copper sulfate concentrations, whereas fungus was not present. Predictably, degree of pH, bath volume, and perhaps water quality influence the duration of activity. The loss of antiseptic effectiveness was considered when pH exceeds 5 (20).

One of the reasons footbaths lose their effectiveness and need to be changed is that manure accumulation in the footbath causes the pH to rise. The copper becomes bound and is unable to serve in its antibacterial role (8,15). Concentration of copper sulfate should not be higher than 5% in order to

reduce soil toxicity (5,11). Fortunately, producers have options to reduce copper sulfate use, including pH adjusters that can safely lower the pH of footbath water to better ionize the copper. More ionized copper allows for more available copper in footbath, and that means a more efficient footbath that requires less copper sulfate on the farm and in the environment (9,12).

However, the empirical recommendation around 150-200 cow passes (4,12) appears to have merit and in large herds matches typical pen sizes, so that solutions can be changed between pens as they are milked. Such an approach is somewhat time consuming and intensive, but between herds under a variety of different circumstances, solution changes have been recommended typically after 100 to 300 cow passes (10,12,16).

Based on this study showed that pH of 4% CuSO₄ were not reach 5.0 and allowing 360 cow passes through footbath. Several control strategies have been recommended, including maintaining a clean, dry environment, individual topical treatment of affected cows, and herd-level strategies, including

footbathing (12). Footbaths are a common preventative approach due to the labor involved in treating large numbers of affected cows, along with strong evidence from intervention trials supporting footbath efficacy in reducing Digital Dermatitis (DD) prevalence compared with negative controls (4,11,14). However, there is a wide variation in on farm practices related to footbath management (4,9,10,12). Administration of parenteral antibiotics in combination with footbath was also highly effective to treat the acute foot diseases (21).

Proper use and management by maintaining of pH value can improve efficacy of footbaths (10,12,20). These findings suggest a gap between evidence-based management practices and on-farm implementation of footbaths. Most studies have compared chemicals and concentrations used in footbaths, but there is a paucity of research focused on number of cow passing of CuSO_4 under 5% footbath practices for hoof prevention (8,12). One study assessed effects of various footbath dimensions on number of foot immersions and recommended long (3 m) and deep (0.28 cm) footbaths to optimize chemical delivery to cows' feet (4,9,12). However, in that study, the number of cow passes of various footbath concentration were not reported.

It should be noted that there is limited research on when is the optimal time to change footbath solutions. Currently, it is not known if the optimal interval for changing footbath solutions is dependent upon time (4,10), pH changing and number of cow passes. In addition, the optimal interval for changing footbath solutions may vary from dairy to dairy depending upon cleanliness of cows, footbath size and footbath solution (10,12,20). Developing and control of pH changing of footbath may allow some producers to reduce the frequency of changing footbath solutions, while effectively controlling lameness and hoof lesions.

It is recommended that footbath solutions be changed every 360 cows in a 4% CuSO_4 footbath solution where the pH was no exceed than 5. If group

sizes less than 300 cows, if producers used less concentration of CuSO_4 (2%), they should alter times to replace the footbath solutions in every 168 cows, so that cows in each group have access to fresh solution periodically. 4% CuSO_4 solution are active for around 360 cow passes, while 2% CuSO_4 solution may last only 168 passes. Activity will also depend on the amount of manure contamination.

As a result using less copper sulfate to around 2 to 4 percent instead of 5 to 10 percent to reduce soil toxicity and still have effectiveness prevent lameness and hoof-related lesions. Finally, more research needs to be conducted to determine efficacy of commercially available footbath products. In addition, a quick test needs to be developed to allow the producer to determine when the footbath solution is no longer effective in preventing and controlling hoof lesions. Implementation of a proper footbath design and improvement of footbath management through standardization of a protocol based on scientific literature decreased prevalence hoof lesions and lameness. The footbath design entailed a CuSO_4 footbath solution that measured 2.2 m long, 0.90 m wide, 0.15 m high, with three times a week footbath protocol using 2% and 4% CuSO_4 for 3 consecutive milkings, replaced at a maximum of 168 cow passes for 2% CuSO_4 and 360 cows for 4% CuSO_4 . pH greater than 5 indicated the antiseptic effect has been lost. 2% CuSO_4 solution should be changed after 168 cows passed through the footbath and recommended in small herd. It is suggested to us 4% CuSO_4 in order to maintain mean pH, antiseptic effect, absence of microbial agent and footbath volume that decrease during passage for allowing 360 cows in big herds. Therefore, we concluded that following science-based recommendations on footbathing practices was effective on less copper sulfate concentration. In addition, improving cow cleanliness would further result in prevent of hoof diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank participating farmers for their willingness, time, and financial contributions on this project. We are especially grateful for Ataturk University, Erzurum, Turkey for helping in data collection, support, sponsorship and funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Atasoy N., 2003. Erzurum yöresinde süt siğirlerinde görülen ayak hastalıkları insidansı ve bunların sağaltımı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 14, 1, 1-5.
- Solano L., Barkema HW., Jacobs C., Orsel K., 2017. Validation of the M-stage scoring system for digital dermatitis on dairy cows in the milking parlor. *Dairy Sci*, 100, 1592-1603.
- Relun A., Lehebel A., Chesnin A., Guatteo R., Bareille N., 2013. Association between digital dermatitis lesions and test-day milk yield of Holstein cows from 41 French dairy farms. *Dairy Sci*, 96, 2190-2200.
- Fjeldaas T., Knappe-Poindecker M., Boe KE., Larssen RB., 2014. Water footbath, automatic flushing, and disinfection to improve the health of bovine feet. *Dairy Sci*, 97, 2835-2846.
- Kamiloğlu A., 2014. Çiftlik hayvanlarında ayak hastalıkları. 1.baskı., 60-133, Medipres, Ankara.
- Solano L., Barkema HW., Pajor EA., Mason S., LeBlanc SJ., Zaffino Heyerhoff JC., Nash CGR., Haley DB., Vasseur E., Pellerin D., Rushen J., de Passille AM., Orsel K., 2015. Prevalence of lameness and associated risk factors in Canadian Holstein-Friesian cows housed in freestall barns. *Dairy Sci*, 98, 6978-6991.
- Laven RA., Hunt H., 2002. Evaluation of copper sulfate, formalin and peracetic acid in footbaths for the treatment of digital dermatitis in cattle. *Vet Rec*, 151, 141.
- Potterton SL., Bell NJ., Whay HR., Berry EA., Atkinson OC., Dean RS., Main RJ., Huxley JN., 2012. A descriptive review of the peer and non-peer reviewed literature on the treatment and prevention of foot lameness in cattle published between 2000 and 2001. *Vet*, 193, 612-616.
- Bill E., Lowell M., 2007. Copper sulphate for footbaths – issues and alternatives. Proceedings on the Tri-State Dairy Nutrition Conference, Ohio State University.
- Logue DN., Gibert T., Parkin T., Thomson S., Taylor DJ., 2012. A field evaluation of a footbathing solution for the control of digital dermatitis in cattle. *Vet*, 193, 664-668.
- Evans NJ., Murray RD., Carter SD., 2016. Bovine digital dermatitis: current concepts from laboratory to farm. *Vet*, 211, 3-13.
- Cook NB., Rieman J., Gomez A., Burgi K., 2012. Observations on the design and use of footbaths for the control of infectious hoof disease in dairy cattle. *Vet*, 193, 669-673.
- Krull AC., Cooper VL., Coatney JW., Shearer JK., Gorden PJ., Plummer PJ., 2016. A highly effective protocol for the rapid and consistent induction of digital dermatitis in Holstein calves. *PLoS One.*, 11, e0154481.
- Palmer M., O'Connell N., 2015. Digital dermatitis in dairy cows: A review of risk factors and potential sources of between-animal variation in susceptibility. *Animals (Basel)*, 5, 512-535.
- Nielsen MW., Strube ML., Isbrand A., Al-Medراسي WDHM., Boye M., Jensen TK., 2016. Potential bacterial core species associated with digital dermatitis in cattle herds identified by molecular profiling of interdigital skin samples. *Vet Microbiol*, 186, 139-149.
- Rankin M., 2004. Agronomic and environmental issues with foot bath solution land spreading. Proceedings on the Four-State Dairy Nutrition and Management Conference, Dubuque, Iowa.
- Speijers MH., Finney GA., McBride J., Watson S., Logue DN., O'Connell NE., 2012. Effectiveness of different footbathing frequencies using copper sulfate in the control of digital dermatitis in dairy

- cows. *Dairy Sci*, 95, 2955-2964.
18. Teixeira AG., Machado VS., Caixeta LS., Pereira RV., Bicalho RC., 2010. Efficacy of formalin, copper sulfate, and a commercial footbath product in the control of digital dermatitis. *Dairy Sci*, 93, 3628-3634.
 19. Solano L., Barkema HW., Mason S., Pajor EA., LeBlanc SJ., Orsel K., 2016. Prevalence and distribution of foot lesions in dairy cattle in Alberta, Canada. *Dairy Sci*, 99, 6828-6841.
 20. Cook NB., 2017. A review of the design and management of footbaths for dairy cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Practice*, 33, 195-225.
 21. Yurdakul İ., Özdemir S., 2012. Sığır ayak hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 7, 147-153.



Changes in Sperm Parameters Following Administration of Theophylline, a Competitive Antagonist of Adenosine in Rats Exposed to Bleomycin, a Chemotherapeutic Agent

Saadet BELHAN^{1a}, Gökhan OTO^{2b}, Okan ARIHAN^{3c}, Volkan KOŞAL^{1d}

1. Van Yuzuncu Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Van, TURKEY.
 2. Van Yuzuncu Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Van, TURKEY.
 3. Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Ankara, TURKEY.
- ORCID: 0000-0002-8115-2051^a, 0000-0001-7310-7800^b, 0000-0001-6201-7383^c, 0000-0001-5268-5046^d

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
13.05.2019	05.08.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Belhan S, Oto G, Arihan O, Koşal V: Changes in Sperm Parameters Following Administration of Theophylline, a Competitive Antagonist of Adenosine in Rats Exposed to Bleomycin, a Chemotherapeutic Agent. Atatürk University J. Vet. Sci., 14(3): 246-251, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.563809

Abstract: The aim of the present study is to determine the effects of theophylline (THP), a methylxanthine derivative, on the sperm parameters of rats exposed to bleomycin (BLM) as a chemotherapeutic agent. The study was performed on 32 male rats. The rats in Group 1 were administered only with sterile saline intratracheally. The rats in Group 2 were administered a single dose of 7.5 mg/kg of BLM intratracheally. The rats in Group 3 received a single dose of 7.5 mg/kg of BLM intratracheally. In addition, THP was administered to rats in Group 3 intraperitoneally at a dose of 75 mg/kg/day for 14 days. The rats in group 4 were administered an intraperitoneal injection of THP at a dose of 75 mg/kg/day for 14 days. Motility, sperm density, abnormal sperm and dead sperm rates were examined. Significant deteriorations were observed in sperm parameters of rats that were administered BLM. In sperm parameters of rats that were administered THP, it was determined that it only increased motility, but did not significantly change sperm density, abnormal sperm and dead sperm count. In this study, THP only increased motility. There was no positive effect on sperm parameters except motility.

Keywords: Bleomycin, Rat, Sperm Parameters, Theophylline.

Bir Kemoterapotik Ajan Olan Bleomisine Maruz Kalan Ratlarda Adenozinin Kompetitif Antagonisti Olan Teofilinin Uygulanması Sonrasında Sperm Parametrelerindeki Değişimler

Öz: Bu çalışmanın yapılmasındaki amaç, bir kemoterapotik ajan olan bleomisine (BLM) maruz bırakılan ratlarda metilksantin türevi olan teofilinin (THP) sperm parametreleri üzerinde ne gibi etkiler göstereceğini belirlemektir. Çalışma 32 adet erkek rat üzerinde yapıldı. Grup 1'deki ratlara sadece steril serum fizyolojik intratrakeal yoldan uygulandı. Grup 2'deki ratlara, 7.5 mg/kg BLM intratrakeal olarak tek doz uygulandı. Grup 3'deki ratlara, 7.5 mg/kg BLM intratrakeal olarak tek doz uygulandı. İlave olarak 14 gün boyunca 75 mg/kg/gün dozunda THP intraperitoneal yoldan uygulandı. Grup 4'deki ratlara, 14 gün boyunca 75 mg/kg/gün dozunda THP intraperitoneal yoldan uygulandı. Motilite, sperm yoğunluğu, anormal sperm ve ölü sperm oranları incelendi. BLM uygulanan ratların sperm parametrelerinde ciddi bozulmalar tespit edildi. THP uygulanan ratların sperm parametrelerinde sadece motilitede anlamlı artışlar oluşturduğu, ancak sperm yoğunluğu, anormal sperm ve ölü sperm sayısı üzerinde anlamlı olarak değişiklikler yapmadığı tespit edildi. Bu çalışmada THP sadece motiliteyi arttırmıştır. Motilite dışında sperm parametreleri üzerinde olumlu bir etkisi yoktu.

Anahtar Kelimeler: Bleomisin, Rat, Sperm Parametreleri, Teofilin.

^aSaadet Belhan

Van Yuzuncu Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Van, TURKEY.
e-mail: saadetkaratas@hotmail.com

INTRODUCTION

Bleomycin (BLM) is an antibiotic with a chemotherapeutic characteristic and is produced by *Streptomyces verticillus* bacteria. This antibiotic is predominantly used in the treatment of cancers such as lymphoma, carcinoma and testicular cancer (1). Despite its healing effects, it is acknowledged that BLM causes several undesirable side effects on the respiratory system, gastrointestinal tract and the reproductive system (2,3). Earlier studies reported that BLM reduced sperm motility and adversely affected sperm morphology through affecting the gonadal cells on male reproductive system (4,5,6). It is known that the application of chemotherapeutics generally results with a serious damage on the seminiferous epithelium of the testis (7). It was reported that approximately 50-70% of BLM was eliminated through the kidneys (8).

Theophylline (1,3-dimethylxanthine; THP), a competitive antagonist of adenosine induced via ATP hydrolysis, is a member of the xanthine family and is naturally present in tea. THP has a vasodilatory effect on the renal vascular bed and also affects smooth muscle cells in the bronchi of asthma patients (9-15). Furthermore, an additional acknowledged characteristic of THP is the inhibition of the phosphodiesterase enzyme that inactivates cyclic adenosine mono phosphate (cAMP). Phosphodiesterase enzyme inhibitors are key regulators of intracellular cAMP levels. It is known that spermatogenesis is regulated by the cAMP-dependent mechanism (16).

It was reported that high concentrations of THP adversely affected spermatogenesis and caused infertility through inhibiting the support functions of sertoli cells (15). Previous studies also reported that high doses of THP caused decreases in testis weight and increased abnormal sperm count (14,17).

The conducted literature review indicated that several methylxanthines such as THP were added to sperm suspensions with the intent to improve sperm functions, however high dose administrations

resulted with a reprotoxic effect. Therefore, in this study, we investigated whether THP had a curative effect on the negative effects of BLM on sperm parameters.

MATERIALS and METHODS

Chemicals

A commercial preparate of BLM (Bleocin; bleomycin hydrochloride; Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) was obtained from a pharmacy. THP (Theophylline, Product code: T-1633) was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Louis Aldrich St. Louis, Mo., USA). Other materials used in the study were present in the Department of Reproduction and Artificial Insemination in the Faculty of Veterinary Medicine in Van Yüzüncü Yil University, Van, Turkey.

Animals

The study was performed on 32 male rats. Animals were obtained from the Experimental Animals Center of the Van Yuzuncu Yil University. Standard temperature, humidity and light/dark conditions were provided for the rats. The rooms were cleaned and ventilated daily and an appropriate environment was provided. The rats were provided with clean and fresh feed and water.

Experimental Design

Necessary permissions were obtained from the Local Ethics Committee of Animal Experiments of Van Yuzuncu Yil University (Authorization number: 2019/05). Ethical rules were complied with in all applications. 32 male rats were divided into 4 groups.

1. Control Group (n=8): Sterile saline was administered intratracheally.

2. BLM Group (n=8): BLM was administered as a single dose of 7.5 mg/kg intratracheally.

3. BLM + THP Group (n=8): BLM was administered as a single dose of 7.5 mg/kg intratracheally. Additionally, THP was administered

intraperitoneally at a dose of 75 mg/kg/ day for 14 days.

4. THP Group (n=8): THP was administered intraperitoneally at a dose of 75 mg/kg/ day for 14 days.

At the end of the study, each rat was anesthetized via ketamine hydrochloride 75 mg/kg and xylazine hydrochloride 10 mg/kg administration. Subsequent to the formation of a full anesthesia, testicles were rapidly removed before they lost temperature, the cauda epididymis was retrieved and the spermological evaluation was performed. Especially the motility examination was performed very quickly, before the tissue lost its temperature.

Obtaining Semen and Evaluation of Spermological Traits

Immediately after the testes were removed before losing their temperature, the motility measurement of the sperm, obtained from the cauda epididymis section via small incisions with the help of a scalpel, was carried out by means of a heated plate microscope (plate temperature was adjusted to 37 °C). During motility examination, the sperm was diluted with isotonic saline on the heated plate. Subsequently, the cauda epididymis was divided into small pieces with a scalpel in a petri dish (0.9% w/v NaCl) containing 2 ml of physiological saline, for evaluation of other spermological parameters. The samples were kept at the room temperature for 10 minutes in order to ensure the maximal sperm passage. Density, abnormal sperm and dead sperm examinations were performed with this suspended mixture (18). Previously described methods were

Table 1. Sperm parameters of all groups.

Tablo 1. Tüm grupların sperm parametreleri.

Groups	Motility Rate (%)	Density (x10 ⁶)	Dead Sperm Rate (%)	Abnormal Sperm Rate (%)		
				Head	Tail	Total
Control (n=8)	67.50±2.67 ^b	81.75±1.75 ^a	14.62±0.74 ^b	8.25±0.70 ^b	4.62±0.91 ^b	12.87±0.83 ^b
BLM (n=8)	43.12±2.58 ^d	46.50±16.81 ^b	35.75±0.88 ^a	16.50±1.19 ^a	12.37±1.30 ^a	28.87±0.83 ^a
BLM+THP (n=8)	49.37±1.76 ^c	51.75±1.66 ^b	34.87±0.35 ^a	16.12±1.35 ^a	12.00±1.30 ^a	28.12±0.83 ^a
THP (n=8)	71.25±2.31 ^a	83.25±1.16 ^a	13.75±0.46 ^b	7.87±0.99 ^b	4.25±0.88 ^b	12.12±0.99 ^b

BLM: Bleomycin, THP: Theophylline

Note: Different lettering (a, b, c, d, e) on the same columns indicate significant differences among groups (P <0.001).

used for the evaluation of sperm density and morphology (18,19,20).

Statistical Analysis

SPSS software was used to evaluate the data statistically. Differences between groups were determined via the Post hoc Tukey-HSD test and one-way analysis of variance (ANOVA). The obtained values were presented as mean ± standard deviation.

RESULTS

Sperm Parameters

The detailed results of motility, density and abnormal sperm and dead sperm ratios for all groups were presented in Table 1 and Figure 1. It was determined that the motility and density values of the BLM group were significantly lower than the control group (P<0.001). The examination among groups indicated that the most significant increase in the number of abnormal sperm and dead sperm was detected in the BLM group. Sperm density of the THP group was found to be increased when compared to the control group, however, such increase was not statistically significant (P>0.05). In the THP + BLM group, THP had no effect on morphological disorders. In the present study, it was determined that THP administration resulted with an increase, especially in motility, when compared to the control and other treatment groups, and such finding was statistically significant.

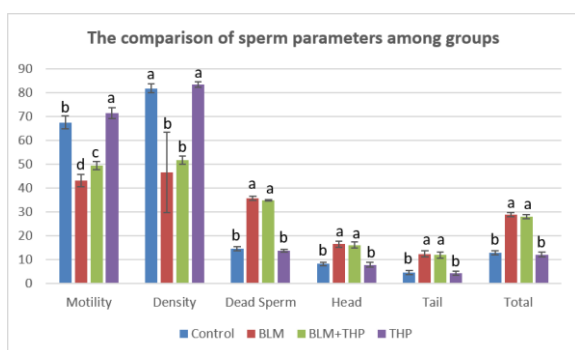


Figure 1. The comparison of sperm parameters among groups.

Şekil 1. Gruplardaki sperm parametrelerinin karşılaştırılması.

DISCUSSION and CONCLUSION

Mammalian sperm is an excellent marker for monitoring the potential effects of chemical agents on the male reproductive system. BLM is used in the treatment of several cancers. However, several concerns are present regarding the continuity of its use in treatment due to its side effects. In the present study, it was determined that sperm density and motility in rats significantly decreased compared to the control group due to BLM treatment, and our findings were similar with the deteriorations in the sperm parameters caused by BLM, reported in previous studies (4-6). Furthermore, increase in abnormal sperm and dead sperm ratios was consistent with the outcomes of previous studies (4,5).

Due to their known phosphodiesterase inhibitory effects, methyl xanthines positively affected sperm motility, capacitance and acrosome reaction due to an increase in sperm cAMP levels (21-24). It was reported that methyl xanthines such as pentoxifylline, caffeine and THP, which were added to sperm suspensions to improve sperm characteristics, improved sperm function (25-27).

The administration dose and duration of phosphodiesterase inhibitors were found to be influential in terms of their efficiency (28). Caffeine, pentoxifylline and THP, which are non-selective phosphodiesterase enzyme inhibitors were specified to increase sperm motility, however such effect was

not obvious in vivo and even high-dose caffeine was reported to have adverse effects on fertility (29). A conducted study reported that the effects of THP administered at 800 ppm dose for 18, 30 and 42 days varied depending on the duration of administration, especially abnormal sperm count increased in rats, administered THP for 30 and 42 days, and no adverse effects were observed in sperm parameters due to 18 days of application. In a study conducted by Tengowski et al. (14), it was determined that longer the duration of administration caused higher the deterioration, thus, was reported to have a reprotoxic effect at high concentration and prolonged exposure. The results of the present study were similar to the results of the 18-day administration. In the present study, THP was administered at a dose of 75 mg/kg for only 14 days and no problems were detected. Decreases in testis weight and abnormal sperm count were detected in another study, which focused on THP administration for 13 weeks (17). Of the rats, which were treated with the methylxanthines caffeine, theobromine or THP between the 14th to 75th weeks of age, aspermatogenesis or oligospermatogenesis were reported in 85-100% of those treated with caffeine or theobromine, whereas THP caused severe testicular atrophy in 14% of rats and moderate atrophy in 71% (15). The findings of the present study were not consistent with the results of that study due to the short duration of administration. In the present study, there was no statistically significant change in abnormal sperm count due to THP administration.

In conclusion, the present study established that THP did not have a statistically significant effect on the sperm density, morphology and dead sperm ratio, in cases where the destructive effects of BLM on sperm parameters were present. However, we would like to draw attention to the significant increase in sperm motility due to THP, a non-specific phosphodiesterase enzyme inhibitors, in the present study, given the fact that weak sperm motility is an important factor in male infertility and there is a

strong correlation between sperm motility and fertility. Considering such effect of THP, it is possible that several further studies could facilitate its use in assistive reproductive technology, serving as an auxiliary therapeutic agent in alleviating male infertility.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Du L., Sanchez C., Chen M., Edwards DJ., Shen B., 2000. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol*, 7, 623-642.
2. Jules-Elysee K., White DA., 1990. Bleomycin induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med*, 11, 1-20.
3. Mano MS., Guimaraes JL., Sutmöller SF., Reiriz AB., Sutmöller CS., Di Leo A., 2006. Extensive deep vein thrombosis as a complication of testicular cancer treated with the BEP protocol (bleomycin, etoposide and Cisplatin): case report. *Saao Paulo Med J*, 124, 343-345.
4. Amirshahi T., Najafi G., Nejati V., 2014. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin- induced male rats. *Iran J Reprod Med*, 12, 209-216.
5. Ojo OO., 2017. Induction of Apoptosis by Bleomycin Compound in testis of Swiss albino mice. *AJRFANS*, 19, 21-27.
6. Razavi S., Khadivi F., Hashemi F., Bakhtiari A., 2019. Effect of zinc on spermatogenesis and sperm chromatin condensation in bleomycin, etoposide, cisplatin treated rats. *Cell J*, 20, 521-526.
7. Schilsky RL., Lewis BJ., Sherins RJ., Young RC., 1980. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med*, 93, 109-114.
8. Madabhavi I., Modi G., Patel A., Anand A., Panchal H., Parikh S., 2017. Pulmonary toxicity following bleomycin use: A single-center experience. *J Cancer Res Ther*, 3, 466-470.
9. Bokuchava MA., Skobeleva NI., 1980. The biochemistry and technology of tea manufacture. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 12, 303-370.
10. Heidemann HT., Müller S., Mertins L., Stepan G., Hoffmann K., Ohnhaus EE., 1989. Effect of aminophylline on cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Br J Pharmacol*, 97, 313-318.
11. Modlinger PS., Welch WJ., 2003. Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 497-502.
12. Osswald H., 1975. Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 288, 79-86.
13. Osswald H., 1983. Adenosine and renal function. *Regulatory Function of Adenosine*. Springer US, 399-415.
14. Tengowski MW., Feng D., Sutovsky M., Sutovsky P., 2007. Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of theophylline- or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats. *Biol Reprod*, 76, 149-163.
15. Weinberger MA., Friedman L., Farber TM., Moreland FM., Peters EL., Gilmore CE., Khan MA., 1978. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J Environ Pathol Toxicol*, 1, 669-688.
16. Nantel F., Monaco L., Foulkes NS., Masquillier D., LeMeur M., Henriksen K., Dierich A., Parvinen M., Sassone-Corsi P., 1996. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*, 380, 159-162.
17. Morrissey RE., Collins JJ., Lamb JC., Manus AG., Gulati DK., 1988. Reproductive effects of

- theophylline in mice and rats. *Fundam Appl Toxicol*, 10, 525-36.
18. Aksu EH., Akman O., Özkaraca M., Ömür AD., Uçar Ö., 2015. Effect of *Maclura pomifera* extract against cisplatin-induced damage in reproductive system of male rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 397-403.
 19. Belhan S., Özkaraca M., Kandemir FM., Gülyüz F., Yıldırım S., Ömür AD., Yener Z. 2017. Effectiveness of hesperidin on methotrexate induced testicular toxicity in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23, 779-786.
 20. Turk G., Atessahin A., Sonmez M., Ceribasi AO., Yuca A., 2008. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril*, 89, 1474-1481.
 21. Garbers DL., 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochem*, 10, 1825-1831.
 22. Hoskins DD., Hall ML., Munsterman D., 1975. Induction of motility of immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod*, 13, 168-176.
 23. Fraser LR., Monks NJ., 1990. Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. *J Reprod Fertil Suppl*, 42, 9-21.
 24. Monks NJ., Fraser LR., 1987. Phosphodiesterase activity of mouse sperm incubated under conditions that modulate fertilizing potential in vitro. *Gamete Res*, 18, 85-97.
 25. Fraser LR., 1979. Accelerated mouse sperm penetration in vitro in the presence of caffeine. *J Reprod Fertil*, 57, 377-384.
 26. Loughlin KR., Agarwal A., 1992. The use of theophylline to enhance sperm function. *Ach Androl*, 28, 99-103.
 27. Negri P., Grechi E., Tomasi A., Fabbri E., Capuzzo A., 1996. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Hum Reprod*, 11, 1236-1239.
 28. Kızılay F., Altay B., 2018. Effect of phosphodiesterase Type-5 inhibitors on semen parameters. *Androl Bul*, 20, 54-60.
 29. Drobnis EZ., Nangia AK., 2017. Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents. *Adv Exp Med Biol*, 1034, 13-24.



The Effects of Borage Oil on Hyperlipidemic Diet-induced Liver Damage in Male Golden Syrian Hamsters

Mohammad ALHILAL^{1a}, Suzan ALHILAL^{2b}, Thana ALBAZ^{3c}

1. Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Erzurum, TURKEY.
 2. Albaath University, College of Sciences, Department of Chemistry, Homs, SYRIA.
 3. Tishreen University, College of Agriculture, Department of Basic Sciences, Latakia, SYRIA.
- ORCID: 0000-0002-2832-8409^a, 0000-0002-9372-9364^b, 0000-0002-1871-1420^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
31.12.2018	09.09.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Alhilal M, Alhilal S, Albaz T: The Effects of Borage Oil on Hyperlipidemic Diet-induced Liver Damage in Male Golden Syrian Hamsters. *Atatürk University J. Vet. Sci.*, 14(3): 252-262, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.505675

Abstract: This study was designed to examine the hepatoprotective effects of Borage seed oil rich in Gamma Linolenic acid (GLA) against hyperlipidemic diet-induced liver damage in the male golden Syrian hamster. In this experiment a total of 60 animals of male hamsters were used. This experiment was carried out in 2 periods. The first period lasted 4 weeks, in which hamsters were segregated into 4 groups. S1 served as control (given a commercial rodent diet only). Other groups, S2, S3 and S4 were fed with a diet containing of %80 commercial rodent diet + 20% fats (Hyperlipidemic Diet). The second period lasted 4 weeks, in which S2 only that continued fed with hyperlipidemic diet. S4 was orally gavaged with borage oil at 2 g/kg of the body weight daily. Hyperlipidemic diet intake caused lipid accumulation in hepatocytes and significantly ($P<0.05$) increased the activities of ALT, AST, ALP, LDH, GGT and CK enzymes in each of the S2, S3 and S4 groups at the end of the first period. These negative effects were removed only in S4 by the use of borage oil.

Keywords: Borage oil, Enzymes activities, Hamster, Hepatocytes.

Altın Suriye Hamsterlerinde Hiperlipidemik Diyet ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Hodan Yağının Etkileri

Öz: Bu çalışma, erkek altın Suriye hamsterinde hiperlipidemik diyet ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı Gamma Linolenik Asit (GLA) açısından zengin olan hodan yağının hepatoprotektif etkilerini incelenmek için tasarlanmıştır. Bu deneyde, erkek hamsterden oluşan toplam 60 hayvan kullanılmıştır. Bu deney iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşama 4 hafta sürdü, bu aşamada, hamsterler 4 gruba ayrılmıştır. S1 (kontrol), sadece ticari kemirgen diyeti ile beslenmiştir. Diğer gruplar S2, S3 ve S4 ise 80% ticari kemirgen diyeti +%20 yağ içeren diyet ile beslenmiştir (hiperlipidemik diyet). İkinci aşama da yine 4 hafta sürdü, sadece S2 hiperlipidemik diyetle beslenmiştir. S4'e hodan yağı günlük olarak 2g yağ/kg vücut ağırlığı gavaj yoluyla verilmiştir. Hiperlipidemik diyetin alımı, hepatositlerde lipid birikimine neden oldu ve anlamlı olarak ($P<0.05$) ilk aşama sonunda S2, S3 ve S4 gruplarının her birinde ALT, AST, ALP, LDH, GGT ve CK gibi enzimlerin aktivitesini arttırdı. Bu negatif etkiler sadece S4'te hodan yağı kullanımıyla ortadan kaldırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enzim aktiviteleri, Hamster, Hepatositler, Hodan yağı.

✉ Mohammad Alhilal

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Erzurum, TURKEY.
e-mail: mohammad.alhilal15@ogr.atauni.edu.tr

INTRODUCTION

The liver is the main organ of metabolic processes and it is a target for toxic effects. The liver is responsible for carbohydrate and lipid metabolism, apolipoprotein synthesis, and cholesterol removal through the biliary route. For the above reasons, the liver's health should be preserved as much as possible (1). Fatty Liver is described by excess increase of lipids into the liver cells and could be due to abnormal metabolic events such as hyperlipidemia, obesity (2,3). Diets rich in cholesterol and saturated fatty acids (SFA) are two major causes of hyperlipidemia, which mostly induce oxidative stress, which is now believed to be an essential component in the progress of Fatty Liver Disease (4). In fact, the searches for new drugs able to reduce Fatty Liver Disease have gained a great deal of importance in recent years. Lots of research interests have been focused on dietary supplements instead of conventional medicine for many reasons like: absence of side effects and they contain several antioxidants and rare biological compounds. Many traditional oils such as flaxseed and sesame oils were used to reduce blood lipids and improve fatty liver. Positive effects were attributed to the content of these oils from omega-3 fatty acid. Studies about the effect of oils rich in omega-6 fatty acid against fatty liver were poor. As a result of its therapeutic and nutritive capacity, Borage oil has obtained great interest among various research companies worldwide. Because there is high Gamma Linolenic Acid (GLA) in its product (5). The oil maintains antioxidant and free radical scavenging properties (6). In addition to GLA, Linoleic Acid (LA) is present in borage (7). GLA is regarded as omega-6 fatty acid. It is essential fatty acid because it can't be created in the body. It is a very rare fatty acid and found in very few plants. The evening primrose and borage are major sources of GLA. It is necessary to clarify that most researches about borage oil were focused on its role in preventing atherosclerosis (8), therapeutic efficacy against rheumatoid arthritis (9),

obesity, asthma, cancer and acute respiratory distress syndrome (10,11). Unluckily, the hepatoprotective characteristics of borage oil rich in GLA are poorly described. Although GLA reduced the increase in lipids in hepatocytes, it did not affect the liver histology in rats treated with ethanol (12). Borage oil improved the experimental ethanol-induced liver steatosis in rats (13). The purpose of this study was to examine the effect of borage oil rich in GLA against hyperlipidemic diet-induced liver damage in the male golden Syrian hamster.

MATERIALS and METHODS

Animals

60 of male golden Syrian hamsters, weighing between 45 and 50 g and 5-7 weeks age were obtained from experimental animals unit (Directorate of Animal Health, Syria, Damascus). One hamster was kept in a separate cage in an animal room at 22 ± 2 C with a 12/12 h light-dark cycle. The hamsters were fed with commercial rodent diet and water ad libitum for 2 weeks before the treatment to become acclimated. Then they were weighed again, and all the following parameters were measured in the serum; triglyceride, cholesterol, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase (CK).

Animals Treatment and Experimental Protocol

According to the results, the experiment was implemented on 60 healthy animals and passed through two periods. The first period: It lasted for 4 weeks in which the 60 hamsters were divided into 4 groups 15 ones in each group. Group 1 (S1) expressed negative control (fed with commercial rodent diet only). Liver damage was induced to the remaining three hamster groups by eating a diet consisting of 80% commercial rodent diet + 13.5% animal fat +

6.5% coconut oil (Hyperlipidemic Diet) for 4 weeks. At the end of the first period blood samples were taken from food-deprived hamsters (14 h). The samples were centrifuged, collected, and enzymes activities were measured. The considered hamsters with damaged liver were divided into three groups, Group2 (S2), Group3 (S3) and Group4 (S4). The second period: lasted 4 weeks in which S2 continued to be fed with hyperlipidemic diet and named as a fatty liver group. The hyperlipidemic diet was excluded from S3 and S4 only. S4 was orally gavaged with borage oil 2 g/kg of the bodyweight daily and named as borage oil group, whilst S3 named as a positive control group. To make the experience conditions equal in all groups, S1, S2 and S3 were orally gavaged with distilled water 2 g/kg of the body weight daily. S1, S3 and S4 were fed with rodent diet. To reduce the suffering of animals during the experiment, all necessary measures have been taken. All processes on animals were done strictly according to criteria accepted by the management of scientific research laboratories in the College of Veterinary Medicine, Albaath University and after obtaining a decision (date 24.04.2012 and number 1011-12) from the Animal Ethics Committee and the Council of Albaath University.

Oils and Fats

Borage oil was obtained from the cold compressing of borage seeds. Borage seeds used in this study were collected from the region of Hama (west of Syria). Coconut oil: production of an Indian company for Food Industries. Animal fat was collected from the carcasses of sheep.

Compositional Analysis of Fatty Acids

The composition of the fatty acids of borage seed oil was prepared according Garce and Mancha (14). Fatty acids were analysed by Gas Chromatography 3800 coupled with Mass Spectrometry 2000 (GC-MS) using an electron impact ionization (70 eV). Identification of the compounds

was made by matching their recorded mass spectra with those stored in the library of the GC-MS (15).

Biochemical Examination

Two blood samples were taken (once at the end of each period) from food-deprived hamsters (14 h) and collected via the retro-orbital sinus into capillary tubes under anesthesia (16). Taken blood samples which were allowed to clot at normal temperature of the room and centrifuged at 3000 rpm for 30 min. The serums which were not hemolysed were removed at once and kept at -20°C. The activities of the serum enzymes such as, AST, ALT, gamma glutamiltransferaz (GGT), alkalenfosfataz (ALP), LDH and CK were measured with test kits from BioSystems by using Spectrophotometer/BioSystems-Model BTS-310 EU/Spain.

Tissue Processing

The histological examination was evaluated by conventional methods. Livers were immediately excised, immersed in 10% neutral formalin solution for stabilization. After that, 28 samples (liver) were taken randomly at the rate of seven samples from each group. Biopsies were taken from different regions of each sample and embedded in paraffin. For measuring the histological changes in the liver, sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E).

Statistical Analysis

Data were expressed as mean±Standard Deviation (SD). Data were tested using a one way analysis of variance (ANOVA) by a computerized statistics program (USA). $P < 0.05$ was considered to be the least limit of significance.

RESULTS and DISCUSSION

Animal Model Used

Hamsters are frequently used for assessing the effect of hyperlipidemic diet on the lipids metabolism (17,18) Golden Syrian hamsters were used in the

present study, hamster proved to be a useful model in the evaluation of changes after treatment with a high-fat diet (HFD), as well as its small size and ease of handling.

Borage Seed Oil Analysis

In this study, LA (18:2 cis-9,12) and GLA (18:3 cis-6,9,12) were the main fatty acids of the oil, representing 69.89%, 13.21% of the oil respectively (Table 1). Borage seed oil contained a very high proportion of unsaturated fatty acids (UFA) to SFA (87.28% to 12.67%), these results in agreement with the data reported previously (19). The percentage of GLA in this study was 13.21%, while the percentage of GLA was ranged from 17 to 25% (20) and 21 to 23% (21) based on total fatty acids (TFA). The proportion of LA in this study increased in comparison with previous studies (22,23). It may be due to the soil of the region and the time of seed harvesting. This is a positive factor in the Syrian borage oil, especially LA will be converted into GLA in the body. Fatty acid change as a result of growth. LA is in the highest rate while the amounts of GLA and oleic acid start to increase during seed formation stage (7).

Table 1. Fatty acids composition of borage seed oil.

Table 1. Hodan tohum yağının yağ asitleri bileşimi.

Fatty acids	% of total fatty acids
Palmitic (C16:0)	11.65
Stearic (C18:0)	0.61
Oleic (C18:1)	2.71
Linoleic (C18:2)	69.89
G-Linolenic (C18:3)	13.21
Arachidic (C20:0)	0.41
Eicosanoic (C20:1)	1.05
Erucic acid (C22:1)	0.42
SFA	12.67
UFA	87.28

SFA, saturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids.

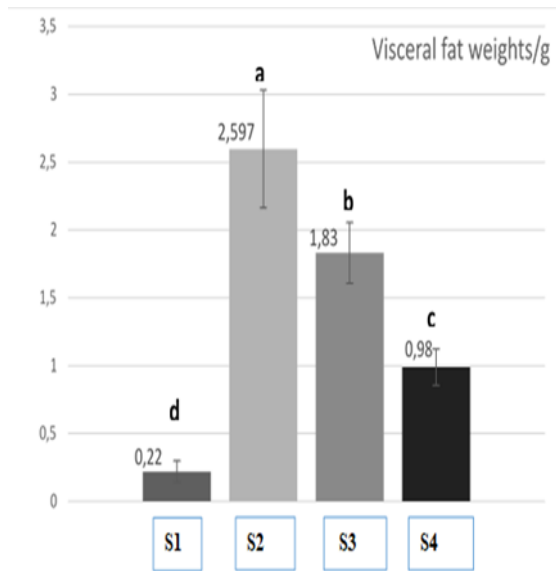
Body Liver and Visceral Fat Weights

At the end of the first period, bodyweights of S2, S3 and S4 were higher ($P<0.05$) than those of S1 (Table 2). After scarifying hamsters, visceral fat and liver were collected and weighed (Fig.1 and Fig.2). The treatment of hyperlipidemic diet after 8 weeks showed a significant increase ($P<0.05$) of visceral fat weights for S2 in comparison with S1 and S3. No changes ($P>0.05$) were observed in liver weights among S1, S2 and S3. HFD increased body weight, adipose tissue in comparison with control mice (24). There was a hug amount of visceral fat and livers in the coconut oil and butter groups compared to the control and flaxseed oil groups (25). In this study the significant increase of the visceral fat after treatment with hyperlipidemic diet, can be attributed to the increase of the triglycerides synthesis in the peripheral tissues, with the aim of lowering the high level of blood lipids, especially that triglycerides are synthesized mainly in the liver and excessed fat is sent from the liver to the periphery. Nowadays fatness is considered as a dangerous problem in Western Countries due to the increasing fat intaking. Increasing fat intake is considered as a major reason to induce fatness, hyperlipidemia and fatty liver. The intragastric administration of borage oil for 4 weeks showed a significant reduction ($P<0.05$) in body and visceral fat weights for S4 in comparison with S2 and S3 (Table 2) and (Fig.1). Intake of GLA can prevent weight regain after weight loss (26). In the present study, the size of visceral fat was decreased upon treatment with borage oil (Fig.3). GLA is metabolized into dihomogammalinolenic acid (DGLA), arachidonic acid (AA) and eventually into various eicosanoids (27). Lower levels of DGLA had increased the body fat (28,29). Most likely, the decrease of body, liver and visceral fat weights in the S4 may be due to the role of GLA in increasing the DGLA, β oxidation and inhibition of fatty acids synthesis.

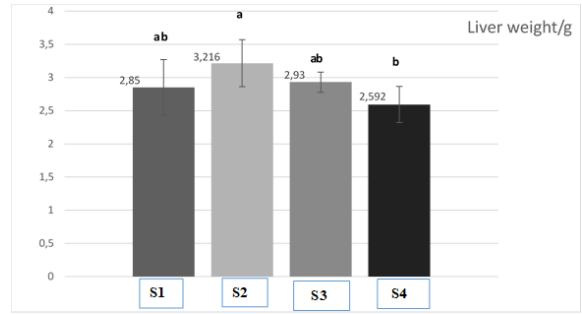
Table 2. Effect of hyperlipidemic diet and borage oil on body weight which is estimated in gram.**Tablo 2.** Hiperlipidemik diyet ve hodan yağının gram olarak tahmin edilen vücut ağırlığına etkisi.

Time Group	Body weight (4 weeks)	Body weight (8 weeks)
S I	48.76±3.32 B	52.92±4.15 C
S II	69.53±4.87 A	74.23±4.58 A
S III	69.38±3.37 A	72.46±3.01 A
S IV	67.23±4.49 A	61.38±3.92 B

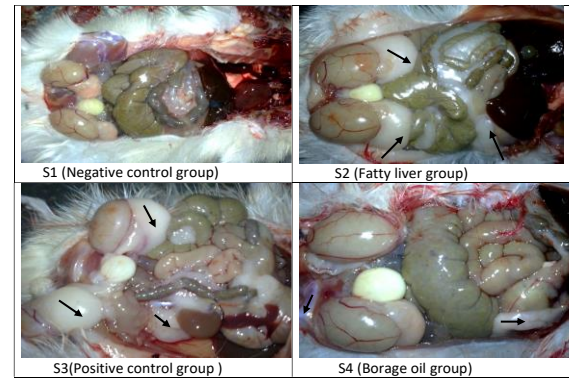
Values are expressed as mean±SD; n=15. Different small letters indicate significant differences in the same row (P<0.05). Different large letters indicate significant differences in the same column (P<0.05). S1 (negative control group), S2 (fatty liver group), S3 (positive control group) and S4 (borage oil group).

**Figure 1.** Visceral fat weights of the experimental hamsters in the end of second period.**Şekil 1.** İkinci aşama sonunda deneysel hamsterlerin iç yağ ağırlıkları.

The data are given as mean±SD; n=15. Mean values with different letters indicate a significant difference (P<0.05). S1 (negative control group), S2 (fatty liver group), S3 (positive control group) and S4 (borage oil group).

**Figure 2.** Liver weights of the experimental hamsters in the end of second period.**Şekil 2.** İkinci aşama sonunda deneysel hamsterlerin karaciğer ağırlıkları.

The data are given as mean±SD; n=15. Mean values with different letters indicate a significant difference (P<0.05). S1 (negative control group), S2 (fatty liver group), S3 (positive control group) and S4 (borage oil group).



group).

Figure 3. Size of visceral fat of the experimental hamsters in the end of second period.**Şekil 3.** İkinci aşama sonunda deneysel hamsterin iç organ yağının büyüklüğü.

Serum Enzymes Activities and Liver Histopathology

Diet composition and fatty liver development are closely related. Accumulation of fat in liver maybe caused by diet. The liver is mostly affected by high blood lipids, followed by an increase in lipid peroxidation (LPO) and free radicals and cell damage (30). Five enzymes were examined to determine the effect of hyperlipidemic diet on the liver. ALT is found in higher activity in cytoplasm. It is primarily localized in hepatocytes (31). AST is a mitochondrial enzyme. The highest activity of AST was observed in the heart muscle. This enzyme is used together with the ALT in assessing liver function (32). ALP is localized in bones.

The main part of the serum ALP activity is influenced by the damage to the liver and bones (33). GGT is existed in hepatocytes and biliary cells. Elevated GGT levels can be noticed in a diversity of nonhepatic diseases, including renal failure and acute myocardial infarction (34). Although LDH is not specific to any organ, but high activity of this enzyme has been observed in cases of myocardial infarction and liver damage in humans (35). Hyperlipidemic diet intake in this study caused a significant increase ($P<0.05$) in the ALT, AST, ALP, GGT and LDH activities approximately (163%, 163%, 23%, 60%, 206%) in each of S2, S3 and S4 groups in comparison with S1 after 4 weeks of feeding (first period) (Tables 3-1, 3-2, 3-3, 3-4 and 3-5). These significant differences increased to reach approximately (214%, 242%, 35%, 103%, 237%) respectively for S2 only in the second period. There was no significant difference ($P>0.05$) in the activities of the enzymes for S3 between the first and second periods (Tables 3-1, 3-2, 3-3, 3-4 and 3-5). Elevated ALT, AST and ALP activities in this study indicate that lipid accumulation was harmful to the liver. The high activity of AST indicates that the damage reached to the mitochondria of hepatic cells.

In the liver, mitochondrial dysfunction, reduces the β -oxidation of fatty acids, because this oxidation occurs in the mitochondria. Consequently, lipid accumulated in the liver. These results in agreement with the data reported previously (36,37,38). As expected, hyperlipidemic diet increased the blood lipids concentrations (This result was not mentioned in the article) and presented lipid accumulation in the liver tissue as shown by H&E staining. This can be viewed as vesicular steatosis, represented by small white vesicles in S3 and large white vesicles in S2 (Fig.4). At the same time no changes had been observed in the liver tissue for S1, where liver cells appeared normal, and the cytoplasm was dark red because it was rich in glycogen (Fig.4). We suppose that elevated levels of SFA, triglyceride and cholesterol exceeded the liver's ability to metabolize them and thus, lipids increased in the blood. As a result, lipids accumulated into the liver and caused damage to hepatic cells, thus led to the flow of large

quantities of enzymes into the blood. In this study, the AST/ALT ratio was (1.2) for S2, S3 and S4 groups in comparison with S1 after 4 weeks of hyperlipidemic diet intake. When the AST/ALT ratio is greater than (1) it indicates the progress of muscle injury (39). This ratio was (1.47) after feeding the hamster on a diet rich in SFA for (15) weeks, and it was associated with damage in the arteries of the heart (40). We hypothesize that this ratio was associated with muscle damage that is likely to be cardiac. This belief was reinforced by the increase of CK activity which was approximately (18%) in each of S2, S3, and S4 groups in comparison with S1 after 4 weeks of feeding a hyperlipidemic diet. This a significant difference had increased to reach approximately (40%) for S2 only in the second period Table 3-6. High CK activity in serum leads to muscle damage (41). Several studies suggested that omega-3 fatty fatty acids may be effective in the treatment of Fatty Liver Disease (42,43). Unfortunately, the effect of omega-6 fatty fatty on Fatty Liver Disease is poorly described. In this study, we figured out the impact of dosed borage oil rich in GLA for a period of 4 weeks on coconut oil and sheep fat-induced liver damage in a male golden Syrian hamster. The hepatoprotective effect of borage oil in this study was evaluated by the using activity of serum enzymes like ALT, AST, ALP, LDH, GGT in addition to hepatic tissue examination. The hepatoprotective effect of Borage oil is clearly seen in normalization of ALT activity, the square of the sudanophylic area and the contents of triglycerides in the liver (13). The intragastric administration of borage oil led to a significant decrease ($P<0.05$) of the ALT, AST, ALP, GGT, LDH and CK activities approximately (53%, 57%, 26%, 30%, 78%, 10%) respectively for S4 in comparison with S3 in the second period Tables 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5 and 3-6. This decrease was accompanied by a reduction in fatty changes for S4 in comparison with S3, where hepatocytes returned to their semi-normal state (Fig.4). The aim of depriving the hyperlipidemic diet in S3 was to observe the decline of negative changes on its own or not. In this study negative effects on serum and liver tissue did not reverse when the hyperlipidemic diet was

deprived. Our results in agreement with the data reported previously (13) which demonstrated that borage oil decreased experimental ethanol-induced liver steatosis and normalized serum marker enzyme activities in rats. Botanical oils enriched in omega-6 fatty acids contributed to the prevention of atherosclerosis and fatty liver in mice (8). The hepatoprotection by borage oil in alcoholic steatosis is interrelated with its antioxidant characteristics.

Borage oil which contains GLA cancelled ethanol-stimulated reactive oxygen species (ROS) production and LPO (13). In the human body, GLA is a product of the conversion of LA. This conversion is organized by a Δ6-desaturase enzyme. This enzyme determines the speed of LA conversion to GLA

(27,28,44). DGLA leads to the production of Prostaglandin E1 (PGE1) which has anti-atherosclerotic effects (8,28). Earlier we found that gastric intubation of borage oil for 4 weeks in hyperlipidemic hamsters caused a significant decrease of serum triglyceride, cholesterol and LDL concentrations. On the other side, it caused significant increasing of HDL concentration (45). That was the positive factor in minimizing the amount of liver lipids in this research. We suppose that the hepatoprotective effect of borage seed oil in this study is associated with the role of GLA and its eicosanoids such as AA in lowering blood lipids and improving the liver tissue and serum enzymes activities.

Table 3. Effect of hyperlipidemic diet and borage oil on activities of some enzymes.

Tablo 3. Hiperlipidemik diyet ve hodan yağının bazı enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi.

Table-3.1		
Time Group	ALT (4 weeks)	ALT (8 weeks)
S1	a 62.84±7.51	a 65.76±7.70
S2	B b 162±12.51	C a 206.69±9.05
S3	A a 159.69±10.01	A a 163.15±13.23
S4	A a 165±10.18	C b 75.76±9.09

Table-3.2		
Time Group	AST (4 weeks)	AST (8 weeks)
S1	a 77.38±13.54	a 72.5±14.38
S2	B b 203.53±20.14	C a 248.42±13.46
S3	A a 201.53±18.28	A a 203.61±17.97
S4	A a 199.92±30.12	C b 86.78±18.80

Table-3.3		
Time Group	ALP (4 weeks)	ALP (8 weeks)
S1	a 227.61±17	a 220.92±7.06
S2	B a 278.76±22.78	B a 299±24.96
S3	A a 279.92±22.91	A a 283.38±22.10
S4	A a 269.15±21.25	B b 208.15±13.25

Table-3.4		
Time Group	GGT (4 weeks)	GGT (8 weeks)
S1	a 55.42±5.35	a 53.97±4.25
S2	B b 81.13±10.45	B a 110±9.41
S3	A a 75.46±6.18	D a 77±8.77
S4	A b 88.75±8.44	C a 53.48±5.21

Table 3. Effect of hyperlipidemic diet and borage oil on activities of some enzymes. (Continued)
Tablo 3. Hiperlipidematik diyet ve hodan yağının bazı enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi. (Devamı)

Table-3.5		
Time Group	LDH (4 weeks)	LDH (8 weeks)
S1	a 504.15±89.69 B	a 477.92±68.50 B
	a 1545.6±205.4 A	a 1612.2±128.4 A
S2	a 1521.61±193.88 A	a 1550.30±159.93 A
	a 1430.8±225.4 A	b 332.38±34.31 C

Table-3.6		
Time Group	CK (4 weeks)	CK (8 weeks)
S1	a 170.38±11.66 B	a 171.92±10.73 C
	b 202.38±11.89 A	a 241.53±12.19 A
S2	a 198.23±7.56 A	a 202.23±7.04 B
	a 201.38±8.96 A	b 180.69±6.27 C

3-1:Serum ALT(U/L), 3-2:AST(U/L), 3-3:ALP(U/L), 3-4: GGT(U/L), 3-5:LDH(U/L) and 3-6:CK(U/L) of the experimental hamsters. Values are expressed as mean±SD; n=15. Different small letters indicate significant differences in the same row (P<0.05), Different large letters indicate significant differences in the same column (P<0.05). S1 (negative control group), S2 (fatty liver group), S3 (positive control group) and S4 (borage oil group).

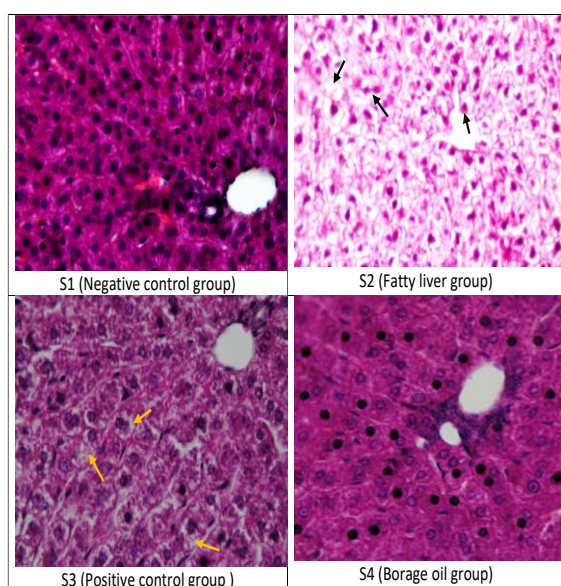


Figure 4. Photomicrography of liver section, stained with H&E (400X).

Şekil 4. Karaciğer bölümünün fotomikrografisi, H&E ile boyandı (400X).

In conclusion, our findings suggest that borage oil supplement can attenuate hyperlipidemic diet-induced liver damage in male golden Syrian hamsters.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to Express our sincere gratitude and appreciation to Albaath University for funding this research and providing all kinds of help and support. Thanks for Mr Muthanna Al Hassan for grammatical and linguistic revision of this article.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Leung PS., 2016. The Gastrointestinal System: Gastrointestinal, Nutritional and Hepatobiliary Physiology; Springer: New York, NY, USA,24-36.
2. Araujo AR., Rosso N., Bedogni G., Tiribelli C., Bellentani S., 2018. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. Liver Int, 38, 47-51.
3. Chalasani N., Younossi Z., Lavine JE., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison SA., Brunt EM., Sanyal AJ., 2018. The diagnosis and management

- of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 67, 328-357.
4. Browning JD., Horton JD., 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114, 147-152.
 5. Nabavi SY., Silva AS., 2018. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. In "Borage (*Borago officinalis* L.)", Tewari D., Bawari S., Patni P., Sah AN, 1st ed., 165-170, London, United Kingdom ; San Diego, CA, United States : Academic Press.
 6. Singh H., Du J., Yi TH., 2017. Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol*, 45, 1310-1316.
 7. Asadi-Samani M., Bahmani M., Rafieian-Kopaei M., 2014. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pac J Trop Med*, 7, 22-28.
 8. Shewale SV., Boudyguina E., Zhu X., Shen L., Hutchins PM., Barkley RM., Murphy RC., Parks J S., 2015. Botanical oils enriched in n-6 and n-3 FADS2 products are equally effective in preventing atherosclerosis and fatty liver. *J Lipid Res*, 56, 1191-1205.
 9. Moelants EAV., Mortier A., Van Damme J., Proost P., 2013. Regulation of TNF-alpha with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*, 91, 393-401.
 10. Gilania AH., Bashira S., Khana AU., 2007. Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *J Ethnopharmacol*, 114, 393-399.
 11. Hamilton LA., Trobaugh KA., 2011. Acute respiratory distress syndrome: use of specialized nutrients in pediatric patients and infants. *Nutr Clin Pract*, 26, 26-30.
 12. Segarnick DJ., Mandio Cordasco D., Agura V., Cooper NS., Rotrosen J., 1985. Gamma-linolenic acid inhibits the development of the ethanol-induced fatty liver. *Prostaglandins Leukot Med*, 17, 277-282.
 13. Lukivskaya OY., Naruta E., Sadovnichy V., Kirko S., Buko VU., 2012. Reversal of experimental ethanol-induced liver steatosis by borage oil. *Phytother Res*, 26, 1626-1631.
 14. Garces R., Mancha M., 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochem*, 211, 139-143.
 15. Adams RP., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. *Allured Publishing, carol stream, IL. J Am Soc Mass Spectrom*, 18, 803-806.
 16. Wilson TA., Kritchevsky D., Kotyla T., Nicolosi RJ., 2006. Structured triglycerides containing caprylic (8:0) and oleic (18:1) fatty acids reduce blood cholesterol concentrations and aortic cholesterol accumulation in hamsters. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 345-349.
 17. Imaizumi K., Abe K., Kuroiwa C., Sugano M., 1993. Fat containing stearic acid increases fecal neutral steroid excretion and catabolism of low density lipoproteins without affecting plasma cholesterol concentration in hamsters fed a cholesterol containing diet. *Nutr*, 123, 1693-1702.
 18. Trautwein EA., Kunath-Rau A., Dietrich J., Srusch S., Erbersdobler HF., 1997. Effect of dietary fats rich in lauric, myristic, palmitic, oleic or linoleic acid on plasma, hepatic and biliary lipids in cholesterol-fed hamsters. *Br J Nutr*, 77, 605-620.
 19. Del Rio-Celestino M., Font R., de Haro-Bailon A., 2008. Distribution of fatty acids in edible organs and seed fractions of borage (*Borago officinalis* L.) *J Sci Food Agric*, 88, 248-255.
 20. Hamrouni I., Touati S., Marzouk B., 2002. Evolution des lipides au cours de la formation et de la maturation de la graine de bourrache (*Borago officinalis* L.). *Riv Ital Sostanze Gr*, 79, 113-118.

21. Gomez A., Martinez De La Ossa E., 2002. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *Chem Eng J*, 88, 103-109.
22. Mhamdi B., Wannas WA., Bourgou S., Marzouk B., 2007. Biochemical characterization of borage (*Borago Officinalis* L.) seeds. *J Food Biochem*, 33, 331-341.
23. De spirt S., Stahl W., Tronnier H., Sies H., Bejot M., Maurette JM., Heinrich U., 2009. Intervention with flaxseed and borage oil supplements modulates skin condition in women. *BJN*, 101, 440-445.
24. Garcia IJP., Cezar JS., Lemos BS., Silva LN., Ribeiro RIMA., Santana CC., Grillo LAM., Pinto FCH., Buzelle SL., Cortes VF., Santos HL., Santos MESM., Barbosa LA., 2008. Effects of high fat diet on kidney lipid content and the Na, K-ATPase activity. *Braz J Pharm, Sci*, 54, 1-13.
25. Tzang BS., Yang SF., Fu SG., Yang HC., Sun HL., Chen YC., 2009. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chem*, 114, 1450-1455.
26. Schirmer MA., Phinney SD., 2007. Gammalinolenate reduces weight regain in formerly obese humans. *J Nutr*, 137, 1430-1435.
27. Guil-Guerrero JL., Gomez-Mercado F., Ramos-Bueno RP., Gonzalez-Fernandez MJ., Urrestarazu M., Rincon-Cervera MA., 2017. Sardinian boraginaceae are new potential sources of gamma-linolenic acid. *Food Chem*, 218, 435-439.
28. Horrobin DF., 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress Lipid Res*, 31, 163-194.
29. Rump P., Popp-Snijders C., Heine RJ., Hornstra G., 2002. *Diabetologia*, 45, 349-355.
30. Huo HZ., Wang B., Liang YK., Bao YY., Gu Y., 2011. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Int J Mol Sci*, 12, 6529-6543.
31. Ozer J., Ratner M., Shaw M., Bailey W., Schomaker S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol*, 245, 194-205.
32. Kinoshian B., Glick H., Garland G., 1994. Cholesterol and coronary heart disease: Predicting risks by levels and ratios. *Ann Intern Med*, 121, 641-647.
33. Hauptman K., Tich F., Knotek Z., 2001. Clinical diagnostics of hepatopathies in small mammals: Evaluation of importance of individual methods. Review article. *Acta Vet Brno*, 70, 297-311.
34. Giannini EG., Testa R., Savarino V., 2005. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *CAMJ*, 172, 367-379.
35. Mc farland MB., 1994. Nursing Implication of Laboratory Testes. 3rd ed., 190-205. Delmar Publishers, Inc.
36. Gloria AO., Oyelola BO., Adenike TO., Anthony AA., 2010. Effects of diet-induced hypercholesterolemia on the lipid profile and some enzyme activities in female Wistar rats. *Afr J Biochem Res*, 4, 149-154.
37. Joanna C., Henryk B., Jadwiga K., Renata F., 2013. The effect of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats addition to the lard diet on antioxidant parameters of plasma and selected tissues in Wistar Rats. *World Acad Sci, ETJ*, 79, 203-211.
38. Abreu ICME., Guerra JFC., Pereira RR., Silva M., Lima WG., Silva ME., Pedrosa ML., 2014. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 58, 251-259.
39. Law M., Rudnicka AR., 2006. Statin Safety: A Systematic Review. *Am J Cardiol*, 97, 52-60
40. Tsai CH., Wu MY., Changl HH., Lin HC., Lee TY., 2008. Obesity induced hepatic oxidative stress down-regulate the level of circulating endothelial progenitor cells. *J Hepatol*, 48, 364-365.
41. Stolcpart RS., Olson KL., Delate T., Rasmussen J., Rehring TF., Merenich, JA., 2010. The risk for significant creatine kinase elevation with statins. *Am J Cardiovas Drugs*, 10, 92-187.

42. Qin Y., Zhou Y., Chen SH., Zhao XL., Ran L., Zeng XL., Wu Y., Chen JL., Kang C., Shu FR., Zhang QY., Mi MT., 2015. Fish oil supplements lower serum lipids and glucose in correlation with a reduction in plasma fibroblast growth factor 21 and PG E2 in nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia: A randomized clinical trial. *PLoS ONE*, 10, 1-13.
43. He XX., Wu XL., Chen RP., Chen C., Liu XG., Wu BJ., Huang ZM., 2016. Effectiveness of omega-3 in NAFLD: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, 11, 1-22.
44. Kapoor V., Glover R., Malviya MN., 2015. Alternative lipid emulsions versus pure soy oil based lipid emulsions for parenterally fed preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 1-171.
45. Alhilal MK., Supuh AM., Hapra N., 2014. Borage oil rich in gamma linolenic acid (GLA) reduces cardiovascular disease (CVD) risk factors in hamsters fed in diet rich in saturated fatty acids (SFAS) and cholesterol. *Bas J Vet Res*, 1, 54-65.



Effect of Graded Supplementation Levels of Golden Chain Tree (*Cassia Fistula L.*) Leaves on Feed Intake, Nutrients Digestibility and Plasma Lipids Profile in Growing Rabbits

Mian Nazir SHAH^{1a}, Aamir IQBAL^{2b}✉, Muhammad RIAZ^{1c}, Samiullah KHAN^{1d},
Muhammad Tahir KHAN^{1e}, Abdur Rahman SIAL^{2f}, Ismail BAYRAM^{2g}

1. University of Agriculture, Department of Poultry Science, Khyber Pakhtunkhwa, PAKISTAN.

2. Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Afyonkarahisar, TURKEY.

ORCID: 0000-0002-1143-1678^a, 0000-0003-4473-2329^b, 0000-0002-2404-1924^c, 0000-0002-7803-8764^d, 0000-0002-7608-1427^e, 0000-0002-7803-7918^f, 0000-0002-9993-7092^g

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
14.06.2019	27.09.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Shah MN, Iqbal A, Riaz M, Khan S, Khan MT, Sial AR, Bayram I: Effect of Graded Supplementation Levels of Golden Chain Tree (*Cassia Fistula L.*) Leaves on Feed Intake, Nutrients Digestibility and Plasma Lipids Profile in Growing Rabbits. Atatürk University J. Vet. Sci., 14(3): 263-272, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.578223

Abstract: The aim of the trial was to explore the effects of graded supplementation levels of Golden Chain Tree Indian Laburnum (*Cassia fistula L.*) leaves on feed intake, nutrients digestibility and plasma lipids profile in growing rabbits. A total number of sixteen male rabbits of Mini Rex Breed at weaning age of 35±5 days having body weight range from 1060-1185 g were divided into total four groups and each group consisted of four rabbits. The *Cassia fistula* leaves were supplemented for ten days with the level of 0% (C), 10% (N), 20% (O) and 30% (P) to formulate four diets for the present study. Results showed that the dry matter digestibility (DMD) was significantly increased (P<0.05) in the N and O group that was being offered 10% and 20% *Cassia fistula L.* leaves. Regarding plasma lipid profile, the low density lipoprotein (LDL) and the triglyceride (TG) values decreased significantly (P<0.05) in all treatment groups as compared to the control group (C), while the HDL (high density lipoprotein) was increased significantly (P<0.05) in all treatment groups as compared to the C group. In group O, that was fed 20% of the *Cassia fistula* leaves, an efficient feed conversion ratio (FCR) was observed over control. *Cassia fistula* leaves at dosage level of 20% could be suggested because it improved the nutritive values of the experimental ration, nutrients digestibility coefficients and plasma lipid profile in rabbits.

Keywords: *Cassia fistula*, Feed intake, Lipid profile, Nutrient digestibility, Rabbits.

Büyüme Dönemindeki Tavşan Rasyonlarına Farklı Oranlarda Altın Zincir Ağacı (*Cassia Fistula L.*) Yaprakları İlavesinin Yem Tüketimi, Besin Maddesi Sindirilebilirliği ve Plazma Lipit Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Öz: Bu araştırma, rasyonlarına farklı düzeylerde (%0, 10, 20 ve 30) altın zincir ağacı=Indian laburnum yaprakları ilave edilen büyüme dönemindeki tavşanlarda yem tüketimi, besin maddeleri sindirilebilirliği ve plazma lipidleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla denemede, canlı ağırlığı 1060-1185 g olan 35 ± 5 günlük süttan kesilmiş toplam 16 adet Mini Rex cinsi erkek tavşan herbirinde 4 adet olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. *Cassia fistula* yaprakları rasyonlara %0 (K), %10 (N), %20 (O) ve %30 (P) düzeylerinde on gün boyunca ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, N ve O gruplarının kuru madde sindirilebilirliği Kontrol (K) ve P grubuna göre anlamlı derecede farklı iken (P<0.05), K ve P grubu değerleri arasında fark bulunmamıştır. Plazma lipit profili ile ilgili olarak, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve trigliserit (TG) değerleri, tüm deneme gruplarında kontrol grubuna (C) kıyasla önemli ölçüde azalırken (P <0.05), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) tüm deneme gruplarında C grubuna göre anlamlı derecede (P <0.05) yüksek bulunmuştur. Diğer deneme grupları ve kontrol grubuna kıyasla grup O'da daha iyi yemden yararlanma oranı (YYO) tesbit edilmiştir. Büyüme dönemindeki tavşan rasyonlarına, %20 oranına kadar altın zincir ağacı yaprakları ilavesinin yem tüketimi, besin maddesi sindirilebilirliği ve plazma lipid profilini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. *Cassia fistula* yaprakları, %20 dozaj seviyesinde önerilebilir, çünkü bu düzey, rasyonların besin maddesi değerlerini, sindirilebilirlik katsayılarını ve tavşanlarda plazma lipid profilini geliştirdiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Cassia fistula*, Lipit profili, Sindirilebilirlik, Tavşan, Yem tüketimi.

✉ Aamir Iqbal

Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Afyonkarahisar, TURKEY.

e-mail: aamir_vet@yahoo.com

INTRODUCTION

With the passage of time, meat requirement has increased. For health maintenance, nutrition in terms of macro and micro-nutrients play a major role in livestock production (1). Pakistan is an agriculture country and livestock is the most important sector of our country. It contributed to agriculture sector about 55.9% while it contributed 11.8% to the national Gross Domestic Product (GDP) (2). To cope with the shortage of animal protein availability, it is necessary to enhance the growth of small livestock with minimum cost. Livestock plays a vital role in developed countries in terms of food, financial and social aspect (3). The major components of meat are lipids and protein. The rabbit meat contains much protein and the presence of high level of essential amino-acids is a characteristic point. The rabbit meat is lack in uric acid but purines are present in small amount. Rabbit meat has lower cholesterol level then the red meat because fat contents are less in rabbit meat ranging from 0.6-14.4% with 6.8% of average value (4). The rabbits are prone to coccidiosis because during coprophagia rabbits consume their feces directly from anus, (5). Rabbit are herbivorous so their feed mostly consisted of dietary fibers (6). To make the rabbit meat more profitable the animal nutritionists are constantly trying to introduce alternative and inexpensive feed resources. *Cassia fistula* has a therapeutic use because it contains a lot of phenols e.g.: Flavonoids and anthraquinone with proanthocyanidine and due to the presence of these compounds. It is antioxidant and responsible for pharmacological actions. The reproductive parts i.e. pods are higher in antioxidant activity than the non-vegetative part (7). Antifungal and antibacterial activity of *Cassia fistula* extract is introduced (8). The active constituent that could be extracted from *Cassia fistula* plant consists of bioflavonoids and proanthocyanidins. Besides these phenolic and their

derivatives, alkaloids like diterpene and triterpenes are also present (9). The dried leaves of *Cassia fistula* Linn belong to the *leguminosae* family. It is used for minimizing the chance of unfavorable effects and to loosen up the intestine (10) due to effect of metabolism concerning energy creation (11).

Nowadays, plant based drugs are used as substitute to synthetic drugs and there is a good scope for using herbal medicines possessing antioxidant and anti hyperlipidaemic property with enough protection and effectiveness. Hence, the present experiment was performed to evaluate the nutritional outcome of *Cassia fistula* leaves in the growth and performance in rabbits fed with different supplemented levels in the ration.

MATERIALS and METHODS

The current study was performed at Department of Poultry Science, University of Agriculture, and Peshawar Pakistan after the approval of the Local Ethics Committee under approval No: Agri-546 on 10-04-2017.

Plant Material and Analyses

The fresh bark of the *Cassia fistula* was collected from Peshawar District, Khyber Pukhtoon Khwa (KPK) province, Pakistan in the month of July to August and the plant was identified and authenticated by the Research Officer (Botany), Central Research Institute, (Ministry of Health and Family welfare, Govt of Pakistan).

A compound sample from basal feed was taken and the DMI, OMI, CPI, EEI NFEI, AshI, dry matter digestibility was analyzed in the Animal Nutrition laboratory of the faculty of Veterinary Medicine, AKU according to manual laboratory analyses methods as explained by Soest et al (12). The feed

sample was grinded by the grinder (Retsch ZM 200, Germany).

Phenols Composition of Cassia fistula Linn

Cassia fistula Linn contains bioactive flavone glycoside 5,3',4'-tri-hydroxy-6-methoxy-7-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-->2)-O-beta-D-galactopyranoside,5-(2hydroxyphenoxy-methyl) furfural,(2'S)-7-hydroxy-5-hydroxymethyl-2 (2'hydroxypropyl) chromone, benzyl2-hydroxy-3,6-dimethoxybenzoate, benzyl2beta-O-D-glucopyranosyl 3,6dimethoxybenzoate,5hydroxymethylfurfural,(2'S)-7-hydroxy-2-(2'-hydroxypropyl)-5 methylchromone, and two oxyanthra quinones, chrysophanol and chrysophanein.

Animal and Management

The experiments of the present study were carried out at Poultry Science Department, and chemical analysis was carried out in the laboratories

of Department of Animal Nutrition Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, The University of Agriculture, Peshawar. Four experimental rations were formulated containing different levels of Cassia fistula Linn leaves to determine its effect on the growth performance of growing rabbits as shown in Table 1. A total of sixteen male rabbits of Mini Rex Breed weaning age 35±5 days having body weight range from 1060-1185 g were selected at randomly to four treatments, with each treatment diets for four rabbits. Before the experiment started clean the cages and the other equipment's such as buckets, feeders and drinkers. Ration ingredients of the groups are presented in Table 1, chemical composition of the Cassia fistula leaves was shown in Table 2 and chemical composition of the experimental diets was given in Table 3.

Table 1: Formulation of the experimental diets.

Tablo 1: Deneysel Diyetlerin formülasyonu.

Ingredients	Cassia fistula 0%	Cassia fistula 10%	Cassia fistula 20%	Cassia fistula 30%
Cassia fistula	0.00	10.00	20.00	30.00
Berseem hay	30.00	20.00	10.00	0.00
MSC	16.00	14.00	12.00	10.00
Sun Flower meal	16.00	14.00	12.00	10.00
Molasses	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat Bran	14.00	14.00	14.00	14.00
Corn grain	14.00	18.00	22.00	26.00
Salt	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Mix	1.00	1.00	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

Table 2. Chemical composition of Cassia fistula leaves (% DM basis).

Tablo 2. Cassia fistül yapraklarının kimyasal bileşimi (% KM temelinde).

Dry Matter (as fed)	Crude protein	Crude fiber	Ether extract	Organic Matter	NDF	ADF	Lignin	Ash	Calcium (g/kg)	Phosphorus (g/kg)
41.3	18.7	25.8	7.6	89.7	35.4	23.1	6.3	10.3	32.7	3.3

Feeds and Feeding

Each animal of the four groups were supplied 200 g of pelleted diet each day. The group C was fed experimental ration containing 0% Cassia fistula Linn

leaves, group N was offered 10% Cassia fistula Linn leaves, group O with 20% Cassia fistula Linn leaves and P with 30% Cassia fistula Linn leaves respectively.

Table 3. Chemical composition of the experimental diet.**Table 3.** Deneysel diyetlerin kimyasal kompozisyonu.

Ingredients	DM %	CP %	OM %	EE %	Ash %	NFE %	TDN %
C.F 0%	88.2	16.6	78.8	15.8	9.49	25.7	55.2
C.F 10%	90.1	16.2	80.3	14.7	9.89	27.8	59.8
C.F 20%	89.6	15.9	79.2	12.3	10.3	29.0	61.0
C.F 30%	90.5	15.8	80.0	11.3	10.2	29.2	56.1

Diet and Serum Analysis

The diet composition was determined in the science and experimental research laboratory of Agricultural University Peshawar Pakistan.

Serum samples was analyzed for LDL, HDL, TG and TC values level by the totally automatic ELISA Machine (Chemwell 2910, Awareness Tech. Inc®, ABD)

Statistical Analysis

In the MS excel, the data was composed and was tested statistically through SPSS program window.16 versions. Complete randomized design was used for the comparison of mean values of different studied variables. To find out the significant differences between the effects of the experimental diets the least significance different test was used.

Table 4. Effect of Cassia fistula leaves on daily feed intake in growing rabbits (Mean ±SE).**Table 4.** Cassia fistül yapraklarının, büyüyen tavşanlarda günlük yem alımına etkisi (Ortalama ± SE).

Feed intake(g/day)		Ration			
		C C.F- 0%	N C.F-10%	O C.F-20%	P C.F- 30%
DMI	Mean	107.2 ^a	96.2 ^b	68.1 ^c	69.6 ^c
	SE	±1.44	±1.42	±1.06	±0.85
OMI	Mean	84.5 ^a	77.3 ^b	55.1 ^c	56.3 ^c
	SE	±1.13	±1.14	±1.52	±0.81
CPI	Mean	17.9 ^a	15.6 ^b	11.8 ^c	11.7 ^c
	SE	±0.24	±0.23	±0.0.68	±0.48
EEI	Mean	16.9 ^a	14.1 ^b	8.3 ^c	8.4 ^c
	SE	±0.22	±0.21	±0.13	±0.17
NFEI	Mean	27.6 ^a	26.8 ^a	20.2 ^b	20.2 ^b
	SE	±0.37	±0.39	±0.52	±0.81
Ash I	Mean	10.1 ^a	9.50 ^d	7.18 ^b	7.31 ^b
	SE	±0.13	±0.14	±0.16	±0.34

The results showed that the group of rabbits feeding the diet supplemented with Cassia fistula leaves showed decreased in daily feed intake in gram per rabbit per day as compared with the control group of rabbits receiving basal diet. The data revealed that the experimental ration supplemented with Cassia fistula leaves did not affect the appetite of the growing rabbits as well as nutrients intake for long period of consumption. Similar results were also found by Rampogal et al (13) and Preeti (14). The intake of dry matter and organic matter were decreased appropriately by adding gradual level to Cassia fistula leaves in the experimental diets.

The reason of decreased intake in growing rabbits was due to coarseness of experimental diet. Supplementation of Cassia fistula leaves that acts as physical barrier to intake of feed or it may be due to occurrence of change in satiety control center in the hypothalamus which under this study was considered (15). The data in the table 4 revealed that the intake of total dry matter of the experimental diet supplemented Cassia fistula

leaves decreased the daily feed intake as dry matter (g/rabbit/day), crude protein (g/r/d) and organic matter (g/r/d). Its reason was that Cassia fistula leaves had no effect on the palatability on the experimental diet of rabbits. The decrease in the daily feed intake in growing rabbits was due to supplementation of Cassia fistula leaves in the diet of rabbits that increases the digestibility of the nutrients of the ration and also increases the metabolism of the experimental ration that reduces in the daily feed intake of growing rabbits (16).

In Vivo Nutrients Digestibility

In the Table 5 the digestibility coefficient for feed nutrients in rabbits is presented. The result showed that the digestibility of dry matter of diets C, N and O were significantly difference ($P < 0.05$) while the ration C and P were non-significant. The finding of the present study revealed that Cassia fistula leaves was moderate quality of legume that could supply enough nutrients to rabbits above maintenance or under physiological conditions of greater nutrients demands.

Table 5. In vivo nutrients digestibility used in the experimental rations (Mean \pm SE).

Table 5. Deney rasyonlarında kullanılan besinlerin in vivo besinlerin sindirilebilirliği (Ortalama \pm SE).

Parameter		Ration			
		C C.F- 0%	N C.F-10%	O C.F-20%	P C.F-30%
Dry matter digestibility	Mean	54.8 ^c	64.3 ^b	75.8 ^a	52.7 ^c
	SE	± 2.78	± 2.05	± 1.49	± 3.27
Organic matter digestibility	Mean	54.3 ^c	62.1 ^b	72.5 ^a	58.0 ^{bc}
	SE	± 2.87	± 1.46	± 1.94	± 2.71
Crude protein digestibility	Mean	57.1 ^c	64.9 ^b	76.9 ^a	62.9 ^{bc}
	SE	± 2.58	± 2.08	± 1.77	± 1.67
Ether extract digestibility	Mean	66.0 ^c	73.4 ^b	81.6 ^a	71.7 ^{bc}
	SE	± 2.70	± 1.60	± 1.48	± 1.66
Nitrogen free extract digestibility	Mean	45.8 ^b	51.2 ^b	59.7 ^a	46.7 ^b
	SE	± 2.08	± 2.43	± 2.39	± 1.73
Ash digestibility	Mean	46.6 ^c	55.3 ^b	66.5 ^a	49.0 ^{bc}
	SE	± 2.58	± 2.38	± 2.13	± 2.61

Diet composition had affected the digestibility of dry matter and organic matter that resulted in significant differences ($P < 0.05$) among the experimental rations for these variables of dry

matter, organic matter and crude proteins. The Cassia fistula leaves present in the experimental ration decreases the interference of the tight junction of the epithelial cells of colon for the

nutrients and ultimately increases the passage of nutrients across the tight junction between the epithelial cells of colon in rabbits (17).

Our result is according to Vanderperren et al (18) where they described that the digestibility coefficient of dry matter, organic matter, and other nutrients contents were observed maximum in the rabbits feeding on diet supplemented with optimum level of Cassia fistula leaves because in large intestine the gut bacteria converts it into active metabolites known as rheinanthrone, that increases the colonic motility and secretion of intestinal fluid. Due to antioxidant activities of these plants, the function of liver is increased that enhanced the secretion of digestive enzymes and ultimately increased the function of digestive system in growing rabbits which was accordance with the results obtained by Hernandez et al (19).

The digestibility coefficient was observed maximum in the group of rabbits receiving

experimental ration C supplemented 20% of Cassia fistula leaves because it provides optimum level of crude fiber in the experimental ration. High level of Cassia fistula leaves supplementation in rabbit's ration increases the crude fiber level above normal that effect the bacteriostatic activity in the caecum of the growing rabbits. Therefore, it reduces the process of microbial protein synthesis and fermentation in caecum that results in decreased caecum microbial population (15,20).

Plasma Lipid Profile

Results showed mean values of triglyceride cholesterol of rabbits receiving experimental ration C, N, O and P were found significant different ($P < 0.05$) among the rabbits group of the experiment (in Table 6). The triglyceride cholesterol mean value was maximum (124.7 mg/dl) for rabbits receiving ration C but was observed minimum (111.6 mg/dl) in rabbits feeding ration P.

Table 6. Effect of supplemented Cassia fistula leaves on plasma lipid profile in growing rabbits (Mean \pm SE).

Table 6. Rasyona ilave edilen Cassia fistula yapraklarının büyüyen tavşanlarda plazma lipid profili üzerindeki etkisi (Ortalama \pm SE).

Parameter		Rations			
		C C.F- 0%	N C.F-10%	O C.F-20%	P C.F- 30%
Total cholesterol (mg/dl)	Mean	76.7 ^a	69.0 ^b	63.3 ^c	60.4 ^d
	SE	± 1.06	± 1.10	± 1.51	± 1.73
LDL Cholesterol (mg/dl)	Mean	35.7 ^a	30.9 ^b	26.3 ^c	21.6 ^d
	SE	± 0.68	± 0.88	± 1.14	± 1.70
HDL Cholesterol (mg/dl)	Mean	34.7 ^d	37.0 ^c	41.0 ^b	45.1 ^a
	SE	± 0.64	± 0.42	± 0.79	± 0.79
TG (mg/dl)	Mean	124.7 ^a	119.1 ^b	114.0 ^c	111.6 ^d
	SE	± 0.95	± 1.16	± 1.35	± 1.41

LDL: Low density lipoprotein, HDL: High Density lipoprotein, TG: Triglyceride

The results showed that supplement feed gradually decreased the total cholesterol, LDL and TG but it increases the HDL and the result of the present study reported by Lim et al (21).

HDL cholesterol concerned in the cholesterol transport from the side-line tissue to the liver and therefore decreases the chance of excess cholesterol storage in the different tissues of the body and the chances of atherosclerosis occurrence.

The LDL lowering effect may be due the increased in metabolism of LDL or may be due to the decreased LDL synthesis from liver (22). The decreased in Triglyceride was due to the activity of lipoprotein lipase enzyme or may be due to an increased in metabolism of LDL (23).

Liver has a vital role in the metabolism of lipid but if large amount of lipid produced in the blood occur due to an imbalance between lipid formation,

lipid degradation and excretion than excessive amount of lipid accumulate within the cells of liver called hepatocytes that cause fatty liver and hepatic steatosis. It is also known as hypercholesterolemia or dyslipidemia patients (24). The use of Cassia fistula plant leaves in the diet of rabbits reduces the chances of toxicity occur due to high fat diet. Study showed that Cassis fistula plant leaves acts as an antioxidant activity that can give protection to the liver of growing rabbits (25).

In present study it is stated that the presence of methanol in the Cassia fistula leaves have an antioxidant characteristics that showed free radical scavenging property and give protection to the rabbit liver from toxicant (26, 27). Supplementation of the experimental diets with Cassis fistula leaves containing methanol under investigation causes the reduction of Triglyceride, Total cholesterol and LDL and the increase in the HDL level. Hence, Cassia fistula leaves have a strong hypotriglyceridemia and hypocholesterolemia effects. These finding seems to be in accordance with another study results (21,26,28,29). The Cassia fistula plant have many products which cause reduction in the cholesterol and phospholipids level by interfering in the absorption of dietary fat and also increased the excretion of endogenous cholesterol (30).

The addition of Cassia fistula leaves in the rabbit ration decreases the lipid per oxidation indicator in the tissue of the body. The propagation of lipid per oxidation chain is prohibited by the poly

phenol content of Cassia fistula leaves by reacting with peroxy radicals. The leaves of the Cassia fistula have antioxidant characteristics due to the presence of phenol content (31). It also gives protection to the antioxidant activity in the living cells that suffer from oxidative stress started by free radicals and hyperlipidemia. Moreover, in one study Hesperidin supplementation improved immun response, antioxidant capacity, HDL percentage of total blood cholesterol pool and growth parameter in human and animal models (32,33).

Body Weight Gain and FCR

The current study showed that body weight gain g/day/rabbit mean values receiving rations C, N and O were significantly different ($P < 0.05$). However, body daily weight gain in g/day/rabbit was statistically non-significant in groups of rabbits receiving diet C and P. Highest daily body weight gain g/day/rabbit was observed in experimental rabbits receiving the diet O supplemented with 20% Cassia fistula leaves. While lowest body weight gain in g/day/rabbit was found in rabbits feeding ration containing 0% Cassia fistula leaves.

The results of feed conversion ratio were presented in Table 7. The overall FCR of the rabbits supplemented graded level of Cassia fistula leaves in their diets was better from the basal diets feeding 0% Cassia fistula leaves.

Table 7. Body weight gain estimation in growing rabbits by difference method (Mean \pm SE).

Tablo 7. Büyüyen tavşanlarda canlı ağırlık artışının fark yöntemiyle tahmini (Ortalama \pm SE).

1 Items		Rations			
		C C.F- 0%	N C.F-10%	O C.F-20%	P C.F-30%
Initial weight (g)	Mean	1322.5 ^b	1336.3 ^{ab}	1339.8 ^{ab}	1356.0 ^a
	SE	± 11.0	± 8.26	± 5.17	± 4.30
Final weight (g)	Mean	1514.2 ^c	1547.8 ^b	1579.4 ^a	1526.0 ^c
	SE	± 4.69	± 3.62	± 3.80	± 3.53
Difference(g)	Mean	191.7 ^c	211.5 ^b	239.6 ^a	169.9 ^d
	SE	± 7.41	± 6.24	± 3.90	± 7.26
Body weight gain (g/day)	Mean	3.05 ^c	3.52 ^b	3.99 ^a	3.19 ^c
	SE	± 0.12	± 0.10	± 0.06	± 0.11
FCR	Mean	6.36 ^a	5.50 ^b	4.19 ^c	5.43 ^b
	SE	± 0.25	± 0.15	± 0.13	± 0.19

FCR: Feed Conversion Ratio

It was also proving from the study that average daily body weight gain was similar among the rabbit's groups feeding on control diet consisting of 0% Cassia fistula leaves and the diet D containing 30% Cassia fistula leaves (20).

The addition of Cassia fistula leaves in the experimental ration as a supplement improved the

feed conversion ratio (g intake/g wt gain) of dry matter, organic matter, crude protein and total digestible nutrients because the Cassia fistula decreases the interference of the tight junction between the colonic epithelial cells and ultimately increases the passage of nutrients through these colonic epithelial junctions (17).

Table 8. Effect of different level of Cassia fistula leaves on profitability parameters (Mean± SE).

Tablo 8. Farklı Cassia fistül yapraklarının karlılık parametreleri üzerindeki etkisi (Ortalama ± SE).

Parameter		Rations			
		C C.F 0%	N C.F 10 %	O C.F 20%	P C.F 30%
Total wt. gain (g)	Mean	191.7 ^c	211.5 ^b	239.6 ^a	183.3 ^c
	SE	±7.41	±6.24	±3.90	± 6.72
Feed cost/rabbit	Mean	34.7 ^a	33.9 ^a	17.9 ^b	12.9 ^c
	SE	±0.87	±0.86	± 0.19	±0.20
Total sale	Mean	47.9 ^c	52.8 ^b	59.9 ^a	45.8 ^d
	SE	±2.80	±2.64	±1.27	±1.70
Profit	Mean	13.1 ^d	18.9 ^c	42.0 ^a	32.9 ^b
	SE	±1.92	± 1.78	± 1.07	±1.49

Total weight gain, profit and total sale increase in O group as compared to other groups however, feed cost decrease in P groups as compared with others groups (in Table 8).

As a conclusion, Cassia fistula leaves used as feed additives (20%) of the diets improved the nutritive values of the experimental ration and nutrients digestibility coefficients in rabbits. In addition, such feed additives affected the plasma lipid profile of the growing rabbits by decreasing total cholesterol, LDL and triglycerides but increasing HDL. The Cassia fistula leaves that contain Anthraquinone and polyphenols may decrease the cholesterol and triglycerides and also stimulate the activity of enzymes of lipid metabolism. The supplemented feed with 20% Cassia fistula leaves has lower value of feed cost per kg live body weight and highest value of relative economic competence.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Indian S., Pulse T., 2003. Tropical and Subtropical Agroecosystems 2, vol. 1, pp. 141–152.
2. Asia E., 2013. Highlights of Pakistan Economic Survey 2013-14, Economic Survey of Pakistan.
3. Autonoma De Yucatan. U., Villanueva-Lopez M., Casanova-Lugo F. Ramirez A., Martinez-Zurimendi L., 2014. Tropical and Subtropical Agroecosystems, Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 17, no. 2, pp. 261-266.
4. Hernandez P., Gondret, F., Rabbit meat quality. 2006.

5. Tafara MM., John F., Emily KF., 2005. The efficacy of banana plant (*Musa paradisiaca*) as a coccidiostat in rabbits. *Intern J Appl Res Vet Med*, 3, 327-331.
6. Larzul C., Imbert B., Bernadet D., Guy G., Remignon H., 2006. Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy and pekin ducks. *Animal Res*, 55, 219-229.
7. Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee MA, Aruoma OI., 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agri Food Chem*, 50, 5042-5047.
8. Duraipandiyar V., Ignacimuthu S., 2007. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *J Ethnopharmacol*, 112, 590-594.
9. Bahorun T., Neergheen V., Aruoma O., 2006. Phytochemical constituents of *Cassia fistula*. *AJFAND*, 4, 1530-1540.
10. Müller P., Basedow T., 2007. Aflatoxin contamination of pods of Indian *Cassia senna* L. (*Caesalpinaceae*) before harvest, during drying and in storage: Reasons and possible methods of reduction. *J Stored Products Res*, 43, 323-329.
11. Nadal SR., Calore EE., Manzione CR., Puga FR., Perez NM., 2003. Effects of long-term administration of *Senna occidentalis* seeds in the large bowel of rats. *Pathol Res Pract*, 199, 733-739.
12. Soest PJ., Robertson JB., Lewis BA., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-3597.
13. Ramgopal M., Attitalla IH., Avinash P., Balaji M., 2010. Evaluation of antilipidemic and anti obesity efficacy of *Bauhinia purpurea* Bark extract on rats fed with high fat diet. *Acad J Plan Sci*, 3, 104-107.
14. Preeti S., 2018. Herbal approach for obesity management. *New Insights in Obes Gene Beyond*, 2, 5-16.
15. Olutayo OS., Olayeni V., 2012. Performance characteristics of weaned rabbits fed graded levels of dry cassava peel fortified with soybean. XV International Feed Technology Symposium Feed-to Food/Cost Feed for Health Joint Workshop.
16. Kocher A., Choct M., Porter MD., Broz J., 2002. Effects of feed enzymes on nutritive value of soyabean meal fed to broilers. *Br Poult Sci*, 43, 54-63.
17. Soyuncu S., Cete Y., Nokay AE., 2008. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. *Clin Toxicol*, 46, 774-777.
18. Vanderperren B., Rizzo M., Angenot L., Haufroid V., Jadoul M., Hantson P., 2005. Acute liver failure with renal impairment related to the abuse of senna anthraquinone glycosides. *Ann Pharmacother*, 39, 1357-1358.
19. Hernandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias MD., 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci*, 83, 169-174.
20. Olorunsanya B., Ayoola MA., Fayeye TR., Olagunju TA., Olorunsanya EO., 2007. Effects of replacing maize with sun-dried cassava waste meal on growth performance and carcass characteristics of meat type rabbit. *LRRD*, 19,1.
21. Lim DW., Song M., Park J., Park SW., Kim NH., Gaire BP., Choi HY., Kim H., 2012. Anti-obesity effect of HT048, a herbal combination, in high fat diet-induced obese rats. *Molecules*, 17, 14765-14767.
22. Latha M., Pari L., 2005. Antihyperlipidemic effect of aqueous extract of *Scoparia dulcis* in albino rats treated with streptozotocin. *J Herbs Spices Medicin Plants*, 11, 59-66.
23. Anderson JW., 2003. Diet first, then medication for hypercholesterolemia. *JAMA*, 290, 531-533.
24. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ., Jessurun J., Boldt MD., Parks EJ., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115, 1343-1351.

25. Amin A., Hamza AA., 2005. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: A possible role of DNA fragmentation. *Toxicology*, 208, 367-375.
26. Zheng S., 2008. Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur J Pharmacol*, 584, 118-124.
27. Ateş A., Esen Gürsel F., Bilal T., Altiner A. 2012. Effect of dietary *Garcinia cambogia* extract on serum lipid profile and serum enzymes in rats fed high-lipid diet. *Iranian J Vet Res*, 13, 1-7.
28. Gorge J., 2010. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a functional formula containing *Prunus mume* in mice fed high-fat diet. *Afr J Biotech*, 9, 2463-2467.
29. Cui B., 2011. Effects of *lycium barbarum* aqueous and ethanol extracts on high-fat-diet induced oxidative stress in rat liver tissue. *Molecules*, 16, 9116-9128.
30. Jakulj L., Trip MD., Sudhop T., von Bergmann K., Kastelein JJP., Vissers MN. 2005. Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe: effects on plasma lipid levels. *J Lipid Res*, 46, 2692-2698.
31. Ignacimuthu S., 2008. Medicinal uses and pharmacological actions of five commonly used Indian medicinal plants: A mini-review. *Iranian J Pharmacol Therapeutics*, 7, 107-114.
32. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*, 85, 633-640.
33. Yatao X., Saeed M., Kamboh AA., Arain MA., 2018. The potentially beneficial effects of supplementation with hesperidin in poultry diets. *Worlds Poul Sci J*, 74, 265-276.
34. Palamidi I., Mountzouris KC., 2018. Diet supplementation with an organic acids-based formulation affects gut microbiota and expression of gut barrier genes in broilers. *Anim Nutrition*, 4, 367-377.



Anthelmintic Activity of Aqueous and Ethanol Extracts of *Urtica dioica* L. and *Myrtus communis* L. Leaves on Bovine Digestive Strongyles: *In-Vitro* Study

Lotfi MOUSSOUNI^{1a}, Omar BESSEBOUA^{2b}, Abdelhanine AYAD^{1c}✉

1. University of Bejaia, Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Biological Sciences of Environment, Bejaia, ALGERIA.

2. University Hassiba Benbouali, Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Agronomic and Biotechnological Sciences, Chlef, ALGERIA.

ORCID: 0000-0001-9547-496X^a, 0000-0003-1365-4479^b, 0000-0002-9325-7889^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
19.04.2019	05.10.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Moussouni L, Besseboua O, Ayad A: Anthelmintic Activity of Aqueous and Ethanol Extracts of *Urtica dioica* L. and *Myrtus communis* L. Leaves on Bovine Digestive Strongyles: *In-Vitro* Study. *Atatürk University J. Vet. Sci.*, 14(3): 273-283, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.555996.

Abstract: The present research aimed to evaluate the in-vitro anthelmintic activity of *M. communis* and *U. dioica* against digestive strongyles in naturally infected cattle. The anthelmintic activities of the extracts were evaluated using the egg hatch assay and larval mortality assay. Leaves powder of *M. communis* and *U. dioica* was extracted by maceration. Ethanolic and water extracts were tested at 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25 and 50 mg/ml. Albendazole and DMSO was used as a positive and negative control at concentration 20 mg/ml and 3%, respectively. The results of regression line indicated that LC50 of *Urtica dioica* EE and EA were very low namely 2.57, 3.02 and 3.22 mg/ml; and 4.90, 4.67 and 3.24 mg/ml for inhibition of embryonation eggs, hatching rate and L1 mortality, respectively. The mean embryonation rate maximum was 100% at 25 and 50 mg/ml concentration in AE and EE *U. dioica*; whereas *M. communis* recorded a maximum level of 57.1 ± 3.12% and 63.95 ± 3.01% at 50 mg/ml concentration for the AE and EE, respectively. The extracts of *U. dioica* leaves high effects (100%) were observed with 25 and 50 mg/ml in both extracts, whereas *M. communis* recorded a high level at 50mg/ml concentration for the AE and EE (58.05±3.69% and 65.13±3.13%, respectively). The larval mortality rate of both AE and EE from *U. dioica* showed that the extracts at 25 and 50 mg/ml exhibited 100 % at 24h of contact. In conclusion, these findings showed that, aqueous and ethanolic extracts of *U. dioica* and *M. communis* leaves have a potential anthelmintic activity on eggs and larvae of bovine strongly parasites.

Keywords: Anthelmintic, Cattle, In-vitro, *Myrtus communis*, *Urtica dioica*.

***Urtica dioica* L. ve *Myrtus communis* L. Yapraklarının Sulu ve Etanolik Ekstraktlarının Sığır Sindirim Strongilozu Üzerine Antelmintik Aktivitesi: İn-vitro Çalışma**

Öz: Bu araştırma, doğal olarak enfekte sığırlarda sindirim strongilozu üzerine *M. communis* ve *U. dioica* in-vitro antelmintik aktivitesini değerlendirmeyi amaçladı. Ekstraktların antelmintik aktiviteleri, yumurta tarama testi ve larva mortalite testi kullanılarak değerlendirildi. *M. communis* ve *U. dioica*'nın yaprak tozu, maserasyon ile özütlendi. Etanolik ve su ekstraktları 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25 ve 50 mg/ml'de test edildi. Albendazol ve DMSO, sırasıyla 20 mg/ml ve %3 konsantrasyonunda pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Regresyon hattı sonuçları, *Urtica dioica* EE ve EA'nın LC50'sinin sırasıyla 2.57, 3.02 ve 3.22 mg/ml olduğundan oldukça düşük değerlere sahipti; ve embriyasyon yumurtalarının inhibisyonu, kuluçka hızı ve L1 mortalitesi değerleri sırasıyla, 4.90, 4.67 ve 3.24 mg/ml idi. Maksimum ortalama embriyasyon oranı AE ve EE *U. dioica*'da 25 ve 50 mg/ml konsantrasyonda %100 iken; *M. communis*, AE ve EE için sırasıyla 50mg/ml konsantrasyonda maksimum % 57.1 ± 3.12 ve % 63.95 ± 3.01 olarak kaydedildi. *U. dioica* özlerinin yüksek etkisi (%100) her iki ekstrede 25 ve 50 mg/ml ile gözlenirken, *M. communis*'de ise AE ve EE için 50mg/ml konsantrasyonda yüksek düzeyde kaydedildi (sırasıyla %58.05±3.69 ve 65.13±3.13). *U. dioica*'nın hem AE hem de EE için larval mortalite oranı, 25 ve 50 mg/ml'deki ekstraktların 24 saatlik temasında %100 olarak görüldü. Sonuç olarak, bu bulgular *U. dioica* ve *M. communis* yapraklarının sulu ve etanolik ekstraktlarının, sığır strongiloz parazit larvaları üzerinde potansiyel bir antelmintik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antelmintik, In-vitro, *Myrtus communis*, Sığır, *Urtica dioica*.

✉ Abdelhanine Ayad

University of Bejaia, Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Biological Sciences of Environment, 06000, Bejaia, ALGERIA.

e-mail: hanine06@gmail.com

INTRODUCTION

Helminthiasis is one of the most widespread infectious diseases affecting mostly in cattle, sheep and goat. In the recent study conducted in Algeria, cattle were shown to be parasitized by several species namely *Eimeria* spp, digestive strongyles, *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum daubneyi*, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia benedeni* and *Toxocara vitulorum* (1). The grazing animals are constantly exposed to parasites and are thus re-infected, as well as delaying it and causing the development of immunity in young people. Despite the use of anthelmintics, the appearance of resistance to common drugs is observed in animals (2,3).

The cattle breeding in the world is subjected to the different constraints, among them the diseases of the gastrointestinal parasitisms. Endoparasites such as digestive strongyles cause significant economic losses such as reduced milk production, reduced weight and mortality (4). Helminths cause damage to the host in several ways, which include damage of gastrointestinal wall and suckling of blood and nutrients.

Medicinal plants are being widely used, either as a single drug or in combination delivery system. The herbal plants are considered as a valuable source of natural products and drugs against various disorders and diseases and also for development of industrial products (5). Because of its bioactive products, phytotherapy based on the use of preparation of medicinal plant remains the most serious alternative to treat or control of many health problems and infections, as an antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antipyretic, immunostimulant (6). Traditional use of medicinal plants as anthelmintics activities of various botanical have been reported, e.g. *Artemisia brevifolia* (7), *Asimina trilobal* (8), *Adhatoda vasica* (9), *Leonotis ocyimifolia* (10), *Leuceana leucocephala* (11), and *Murrabium vulgare* (12) *Urtica dioica* (Urticaceae)

and *Myrtus communis* (Myrtaceae) are plants of Mediterranean and Middle East origin especially in North Africa, e.g. Algeria (13). These plants are used in traditional medicine for the treatment of various diseases. Note that the biological activities of *U. dioica* and *M. communis* are due to bioactive contents such as flavonoids, diterpenoids and phenylethanoid glycosides (14,15). *U. dioica* is known for its antihyperglycaemic activity (16), hepatoprotective effect (17), anti-inflammatory activity (18), antioxidant and antibacterial activities (19). Similarly, *M. communis* have an antioxidant properties (15), antibacterial activity (20), antihyperglycemic activity (21), growth performance, hematological and biochemical parameters (22).

To our knowledge, no work using anthelmintic activity of plant extracts from *M. communis* and *U. dioica* growing in Algeria was reported. The present research aimed to evaluate *in-vitro* the anthelmintic activity of *M. communis* and *U. dioica* against digestive strongyles in naturally infected cattle.

MATERIALS and METHODS

Ethics committee approval was received for this study from the scientific committee of Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia (Report of Faculty Scientific Council N 07 dated December 14, 2014).

Plant Materials

The leaves of *U. dioica* and *M. communis* were collected in March 2015 in the Aokas locality (Bejaia province, Northern Algeria) (36° 36' N, 4° 41' E). The scientific authentication of plants was carried out at the Ecology Laboratory (University of Bejaia, Algeria). After cut in small pieces, both plants were put to drying at room temperature for one week. Thereafter, plant material was pounded using coffee grinder resulting in a fine powder that kept in dark until the use for *in-vitro* anthelmintic test.

Preparation of Extracts

Leaves powder of *U. dioica* and *M. communis* were extracted by maceration technique with ethanol by shaking (Corning® PC-400D hot plate). Briefly, leaves powder was incubated with ethanol 70% and water in the ration 1:10 W/V for 24h and then homogenized through polytron homogenizer (23). The combined ethanolic and water extracts were evaporated to dryness to give crude ethanolic and water extracts. Also, the resulting supernatants were filtered through Whatman paper number 1. The combined ethanolic and water extracts were evaporated at 50 °C to dryness to give crude ethanolic and aqueous extracts (EE and AE, respectively). In order to improve solubility in water, the extract was dissolved in dimethyl sulfoxide solution (DMSO, 3%). A total volume (100 ml) was obtained which produced a stock solution at a concentration of 50 mg/ml from which a series of dilutions were made to obtain solutions at different concentrations 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25 and 50 mg/ml.

Recovery of Eggs from Digestive Strongyles

Fresh eggs were obtained from the faeces of naturally infected cattle according to Chollet *et al.* (24). Briefly, 3g of faeces were collected, homogenized in a mortar, suspended in saturated salt solution (NaCl, d=1.2) and filtered through two sieves (1 and 0.15 mm). Content was centrifuged at 1000 g for 5 min. the supernatant was poured through a 45 µm sieve. The retained material on the sieve containing eggs was washed with tap water to remove the salt solution. It was then turned and the opposite side was washed with tap water. Finally, the eggs were collected in Petri dish (16 cm diameter).

Evaluation of the Ovicidal Activity

The ovicidal efficacy test of the different extracts was performed using two procedures described by Coles *et al.* (25). An egg suspension of 0.2 ml was distributed in a flat-bottomed microtiter plate containing approximately 100 eggs/well and

mixed with the same volume of plant extract giving the following final concentrations: 0.78, 1.55, 3.1; 6.2, 12.5, 25 and 50 mg/ml. The eggs were incubated at room temperature for 24h.

A Lugol iodine solution was added to block eggs hatching. The number of embryonated eggs per well was counted using stereo microscope (at 40x magnification). The percentage of embryonation (EM %) was determined as follows (26).

$$EM (\%) = \frac{\text{Number of embryonated eggs}}{\text{Number of eggs nature}} \times 100$$

After 24h incubation, to assess the effects of the plant extract in the second experiment, all embryonated eggs and first stage larvae (L1) were counted using a microscope (at 40x magnification). The hatching rate (E %) was estimated using the following formula (27).

$$EM(\%) = \frac{\text{Number of larvae 1}}{\text{Number of embryonated eggs in culture}} \times 100$$

Recovery of Nematode Larvae

Eggs were cultured using the technique described by Smyth (28). Briefly, 3ml of the eggs suspension was poured on filter paper covering the bottoms of one Petri dish, then covered to maintain a high relative humidity (65-67%) to prevent the dish from drying out, and stored at +24 °C. After 3 days of incubation, L1 larvae were observed in Petri dish and were collected with a Baermann apparatus.

Evaluation of the Larvicidal Activity

To assess the effects of the extracts on larvae (L₁), 1ml of a solution containing about 15-20 L₁ was distributed in each well of a flat-bottomed microtiter plate and mixed with the same volume of a specific extract. The flat-bottomed microtiter plate was covered and the larvae incubated in at temperature for 24h. The number of dead or immobilized larvae was assessed under a microscope (at 40x magnification). The corrected mortality rate (cMR %) was determined using the following formula (29).

$$cMR (\%) = \frac{Mce - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

Where cMR is the corrected mortality rate (%), Mce is the mortality obtained during the test and Mt is the mortality registered in the negative controls wells. If the mortality rate in the later wells is lower than 5%, cMR=Mce.

Statistical Analysis

The results (mean \pm SD) were expressed as percentage (%). The different rates embryonation (EM %), eclosability (E %) and mortality (cMR %) due to the plant extracts were compared using the chi-square test at 5 significance level. The lethal concentration 50 (LC₅₀) was determined using the regression lines of the SAS Probit according to the decimal logarithm of the concentration. All tests were repeated five times for each treatment and control. Albendazole (ABZ) was used as a positive control at 20 mg/ml concentration.

RESULTS

Table 1 summarize the extracts of *Urtica dioica* and *M. communis* LC₅₀ values of *in vitro* anthelmintic activity test. The results of regression line indicated that LC₅₀ of *Urtica dioica* EE and EA were very low namely 2.57, 3.02 and 3.22 mg/ml; and 4.90, 4.67 and 3.24 mg/ml for inhibition of embryonation eggs, hatching rate and L₁ mortality, respectively. On the other hand, EE and AE of *M. communis* showed important values of LC₅₀ for inhibition of embryonation eggs (28.18 and 31.62 mg/ml, respectively), hatching rate (20.42 and 30.9 mg/ml, respectively) and L₁ mortality (24.55 and 31.84 mg/ml, respectively).

Table 1. The EE and AE fifty lethal concentration (LC₅₀, mg/ml) of *U. dioica* and *M. communis* on inhibiting embryonation, hatchability eggs and mortality L₁ of bovine digestive strongyles.

Tablo 1. U. dioica ve M. communis'ün EE ve AE'nin letal konsantrasyonu (LC₅₀, mg/ml)'nun sığır sindirim strongilozunun L1 mortatilesi, kuluçkalama ve embriyasyonu üzerindeki inhibisyonu.

Extractplants	Inhibiting embryonation	Inhibiting hatching	Mortality L ₁	
<i>U. dioica</i>	Ethanollic	2.57	3.02	3.22
	Aqueous	4.90	4.67	3.24
<i>M. communis</i>	Ethanollic	28.18	20.42	24.55
	Aqueous	31.62	30.9	31.84

The results indicated that the both extract of *U. dioica* leaves seems to be more efficient against gastrointestinal strongyles in different tested stages than the extracts *M. communis*. The variation of mean embryonation rate of digestive strongyles eggs according to the concentrations of extract of *U. dioica* and *M. communis* leaves is shown in Figure 1A and 1B, respectively. The inhibition effect was proportional to the extract concentration. The mean embryonation rate maximum was 100% at 25 and 50 mg/ml concentration in AE and EE *U. dioica*; whereas *M. communis* recorded a maximum level of 57.1 \pm 3.12% and 63.95 \pm 3.01% at 50mg/ml concentration for the AE and EE, respectively. The mean embryonation rate of AE and EE was very low in distilled water and 3% DMSO. Both extracts inhibition of embryonation rate were significantly lower than positive control (P<0.05).

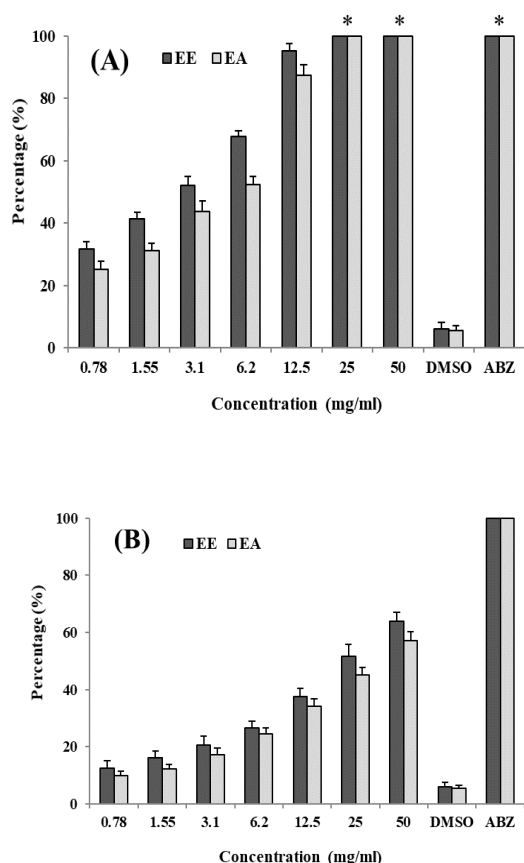


Figure 1. Mean embryonation (EM%, \pm SD) of leaves extract of *U. dioica* (A) and *M. communis* (B) at different concentrations against bovine digestive strongyles.

Şekil 1. Siğır sindirim strongilozuna karşı farklı konsantrasyonlardaki *U. dioica* (a) ve *M. communis* (B) ekstrakt yapraklarının ortalama embriyasyonu (EM%, \pm SD).

*Values by asterisk superscripts in negative and positive control (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are not statistically different ($P>0.05$).

The variation of the mean hatching rate eggs of *U. dioica* and *M. communis* according to the concentration of AE and EE is illustrated in Figure 2A and 2B, respectively. The effect *U. dioica* and *M. communis* varied according to the concentration of both extracts concentration. The extracts of *U. dioica* leaves high effects (100%) were observed with 25 and 50 mg/ml in both extracts, whereas *M. communis* recorded a high level at 50 mg/ml concentration for the AE and EE (58.05 \pm 3.69% and 65.13 \pm 3.13%, respectively).

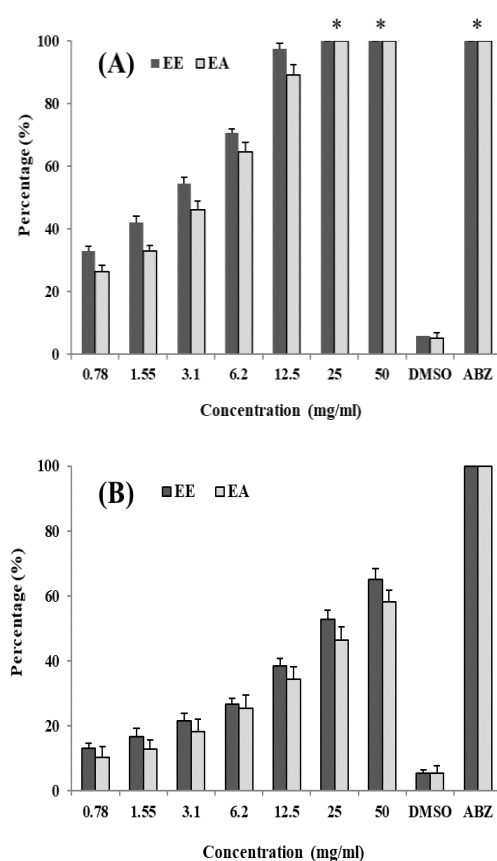


Figure 2. Mean hatchability rate (E%, \pm SD) of leaves extract of *U. dioica* (A) and *M. communis* (B) at different concentrations against bovine digestive strongyles.

Şekil 2. Siğır sindirim strongilozuna karşı farklı konsantrasyonlardaki *U. dioica* (A) ve *M. communis* (B) ekstrakt yapraklarının ortalama kuluçkalama oranı (E%, \pm SD).

*Values by asterisk superscripts in negative and positive control (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are not statistically different ($P>0.05$).

The effects of different extracts of *U. dioica* and *M. communis* on L_1 larvae of gastrointestinal strongyles after 24h of contact are depicted in Figure 3A and 3B, respectively. The larval mortality rate of both AE and EE from *U. dioica* showed that the extracts at 25 and 50 mg/ml exhibited 100% at 24h of contact. At concentration of 3.1 mg/ml, the mean larval mortality rates were similar in AE and EE of *M. communis* (14.4 \pm 2.55 and 14 \pm 2.1%, respectively). Generally, larval mortality rate was concentration dependent in both extract. Distilled

water and 3% DMSO in both AE and EE were 5.8 ± 1.45 and $6.6 \pm 1.27\%$, respectively. On the other hand, *M. communis* recorded $58.05 \pm 2.19\%$ and $65.13 \pm 2.07\%$ for AE and EE at a 25 and 50 mg/ml concentration, respectively.

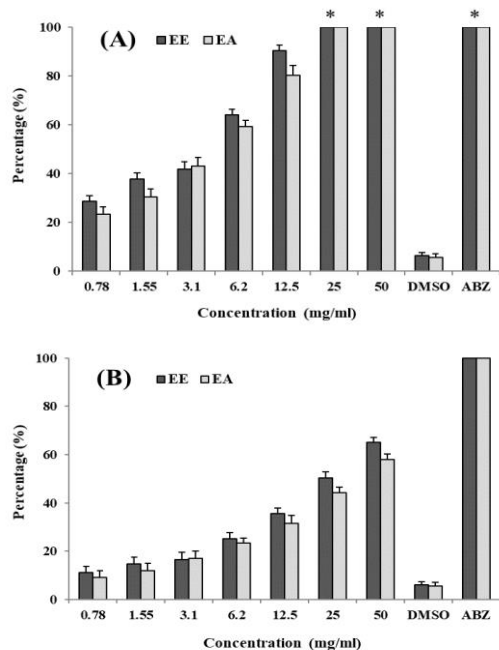


Figure 3. Mean rate of mortality (cMR%, \pm SD) of leaves extract of *U. dioica* (A) and *M. communis* (B) at different concentrations against bovine digestive strongyles.

Şekil 3. Siğır sindirim strongilozuna karşı farklı konsantrasyonlardaki *U. dioica* (A) ve *M. communis* (B) ekstrakt yapraklarının ortalama mortalite oranı (cMR%, \pm SD)

*Values by asterisk superscripts in negative and positive control (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are statistically different ($P > 0.05$).

The mean embryonation rate of AE and EE was very low in distilled water and 3% DMSO. Both extracts inhibition of embryonation rate were significantly lower than positive control ($P < 0.05$).

DISCUSSION and CONCLUSION

For decades, plants extracts have been used in alternative veterinary medicine for the treatment of helminth infections and they constitute today a part of therapy in traditional practice particularly in the

African countries (30). Due to the development of populations resistant to all of the drug families currently available (31) and concerns regarding drug residue in food and in the environment have stimulated the search for alternative control strategies (32). In the attempt to reduce the use of chemicals due to the concern about human health and environmental toxicology, new and safer food control approaches such as the use of natural compounds are nowadays being developed (33). Previous studies showed significant biological activity of the *U. dioica* and *M. communis* extract. The goal of this research is to evaluate the anthelmintic effect of *U. dioica* and *M. communis* extract propose a new therapy alternative against digestive strongyles in cattle. The results of this investigation demonstrated a noticeably inhibitory *in-vitro* effect leaves extracts of *U. dioica* and *M. communis* on the development of eggs and larvae digestive strongyles in naturally infected cattle. Our results support the hypothesis of a direct effect of the active compounds on eggs and larvae with the plant extracts (34). Previous studies reported that *U. dioica* and *M. communis* extracts are rich in bioactive compounds such as flavonoids, diterpenoid, tannins and phenylethanoid glycosides (14,15,35). Moreover, investigations have used *in-vitro* test to screen the individual or combined anthelmintic effect of some plant compounds in bovine (36).

Our results are in agreement with those reported by Al-Shaibani et al. (37) and Moussouni et al. (12) which it presented a remarkable anthelmintic activity of AE and EE of *U. dioica* and *M. communis* leaves. Likewise, various published results indicate that that increased concentrations of plant extracts led an increase anthelmintic activity (12,38). In our *in-vitro* evaluation, DMSO (3%) and ABZ (20 mg/ml) were used as respectively negative and positive control for any direct effects on digestive strongyles and to compare with plant extracts. There was very little inhibitory effect of DMSO on the embryo development and egg hatching, while positive control completely prevented it.

Our results revealed that EE of both extracts gives more satisfactory results than with AE on inhibition of embryonated and egg hatching in bovine digestive strongyles; this in agreement with the results previously described (12,39). These results may be due to the addition of water in the ethanol solution which increased the polyphenols solubility modeling of the organic solvent polarity, whereas water given more amount of yield but only is not good to extract polyphenols (40). In addition, Bimakr et al. (41) explained that the higher concentrations of more bioactive flavonoid compounds were detected with ethanol 70 % due to its higher polarity than pure ethanol. Noted that organic solvent extracts more bioactive compounds from plants than the aqueous extract (42).

Several studies have been conducted to determine the anthelmintic effects of some plants (12,43,44). In this study, LC₅₀ value of both extracts of *U. dioica* showed low activity on inhibiting embryonation, hatchability eggs and mortality L₁ of bovine digestive strongyles compared to AE and EE of *M. communis*. Cela and co-authors (45) reported low LC₅₀ values extract of *M. azedarach* fruits and methanol extract of *T. clausenii* leaves (0.7 and 1.1 µg/ml, respectively). On the other hand, the relatively high values LC₅₀ of *Securidaca longepedunculata* and *Melia azedarach* was recorded (46,47). The LC₅₀ is considerably low indicating that the extract has a wide margin of safety compared to extracts from several medicinal plants. In general, the EE and AE effects of *U. dioica* on inhibiting embryonation, hatchability eggs and mortality L₁ of bovine digestive strongyles from 12.5 to 50 mg/ml concentrations exhibited high activities in our investigation. The observation of aqueous extract of *A. maricata* mentioned by Ferreira et al. (44) were very high (84.91% at 50 mg/ml) compared to AE and EE *M. communis* on inhibiting embryonation, hatchability eggs and mortality L₁ of bovine digestive strongyles. Recently, Moussouni et al. (12) reported similar results of aqueous and ethanolic extract of *M. vulgare* on embryonic

inhibition (48.4 and 54.2, respectively). Also, Hernandez-Villegas et al. (43) provided an important ethanolic extract effect of *Phytolacca icosandra* on inhibition of hatching (97.5% to 3.6 mg/ml) and L1 mortality (89% at 4 mg/ml). The variations observed could be explained by the differences in the composition and content of different biochemical components of plant extracts. In another study, Brunet et al. (48) highlighted the role of tannin-rich plants such as sainfoin on the development of larvae L1 by affecting the drawdown kinetics of *H. contortus* L3. Reduction of nematode egg excretion and worm burden have been also recorded in goats and sheep fed with tanniferous plants (49,50). This observation supports the hypothesis that the chemical structure of condensed tannins is one of the factors modulating their antiparasitic efficacy (51). Equally, Ademola et al. (52) demonstrated the effect of flavonoids and tannins in blocking the migration of L3 larvae of *H. contortus*. In numerous research related that biochemical activity of flavonoids have been attributed to their anti-oxidative and anti-bacterial properties (53). The anthelmintic effects found in our study may be attributed to tannins and saponins penetration into inside the egg and prevent the segmentation of blastomeres (54,55) and blocking the cuticle post-synaptic receptors consequently, paralyzing larval formation (56). It is noted also that active compounds may have induced the release of gamma aminobutyric acid (GABA) which blocked transmission of nerve impulses or decoupling the oxidative phosphorylation reaction which can lead to the exhortion of the energy of larvae (57). In addition, one of the specificities of tannins is their ability to bind to many macro-molecules (58,59) such the enzymes, blocking their activity (60). The founding of this study could be explained by the function inhibition and alteration of some vital process of digestive strongyles such nutrition and penetration into the host tissues.

Our results support reports from the literature in various countries that relationship effects of plant extracts and extract concentration on of embryo eggs

inhibition, hatching rate and larvae mortality. Indeed, the low content of bioactive compounds of *M. communis* induced the weak effect obtained on digestive strongyles when compare to ABZ activity. As regard *U. dioica* extract, the results was similar to positive control, this could be explained by the fact that plant extracts are rich in bioactive compounds A study conducted by Athanasiadou et al. (61) suggests that the inhibitory effect of *Schinopsis quebracho-colorado* extracts on the settlement of *H. cortocus* depended directly on active phytochemical content.

The findings of this study showed that, aqueous and ethanolic extracts of *U. dioica* and *M. communis* leaves have a potential anthelmintic activity on eggs and larvae of bovine strongly parasites. However, the both extracts of *U. dioica* seem to be more efficient against gastrointestinal strongyles in different tested stages than the extracts *M. communis*. In order to test its efficacy, it would be interesting to test the bioactive compounds of both plant extracts. Also, the investigations are necessary to evaluate the toxicity level of *U. dioica* and *M. communis* extracts in laboratory rats.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Moussouni L., Benhanifia M., Saidi M., Ayad A., 2018. Prevalence of gastrointestinal parasitism infections in cattle of Bass Kabylie Area: Case of Bejaia Province, Algeria. *Mac Vet Rev*, 41, 73-82.
- Saeed M., Iqbal Z., Jabbar A., Masood S., Babar W., Saddiqi HA., Yaseen M., Sarwar M., Arshad M., 2010. Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in Beetal goats in an irrigated area (Pakistan). *Res Vet Sci*, 88, 267-272.
- Sutherland IA., Leathwick DM., 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. *Trends Parasitol*, 27, 176-181.
- Nissen S., Poulsen IH., Nejsum P., Olsen A., Roepstorff A., Rubaire-Akiiki C., Thamsborg SM., 2011. Prevalence of gastrointestinal nematodes in growing pigs in Kabale District in Uganda. *Trop Anim Health Prod*, 43, 567-572.
- Ahmed M., Singh MN., Bera AK., Bandyopadhyay S., Bhattacharya D., 2011. Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites. *Asian Pac J Trop Med*, 4, 589-593.
- Laudato M., Capasso R., 2013. Useful plants for animal therapy. *OA Altern Med*, 1, 1-6.
- Iqbal Z., Lateef M., Ashraf M., Jabbar A., 2004. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J Ethnopharmacol*, 93, 265-268.
- Ferreira JF., Peaden P., Keiser J., 2011. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. *Parasitol Res*, 109, 1585-1592.
- Yadav AK., Tangpu V., 2008. Anticestodal activity of *Adhatoda vasica* extract against *Hymenolepis diminuta* infections in rats. *J Ethnopharmacol*, 119, 322-324.
- Egual T., Tadesse D., Giday M., 2011. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol*, 137, 108-113.
- Kabore A., Traore A., Nignan M., Gnanda BI., Bamogo V., Tamboura HH., Bele MAMG., 2012. In vitro anthelmintic activity of *Leuceana leucocephala* (Lam.) De Wit. (Mimosaceae) and *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud (Fabaceae) leave extracts on *Haemonchus contortus* ova and larvae. *J Chem Pharm Res*, 4, 303-309.
- Moussouni L., Benhanifia M., Ayad A., 2018. In vitro anthelmintic effects of aqueous and ethanolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves against bovine digestive strongyles. *Turkiye Parazitol Derg*, 42, 262-267.
- Asgarpanah J., Ariamanesh A., 2015.

- Phytochemistry and pharmacological properties of *Myrtus communis* L. *Indian J Tradit Know*, 1, 82-87.
14. Yoshimura M., Amakura Y., Tokuhara M., Yoshida T., 2008. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J Nat Med*, 62, 366-368.
 15. Franciskovic M., Anackov G., Svircev E., Sibul F., Simin N., Orcic D., Mimica-Dukic N., 2015. Comparative analysis of total phenolic content and biological potential of *Urticadioica* L. and *Urtica kioviensis* extracts. *Planta Med*, 81, PW-212.
 16. Qujeq D., Davary S., Moazzi Z., Mahjoub S., 2011. Effect of *Urtica dioica* leaf extract on activities of nucleoside diphosphate kinase and acetyl coenzyme, a carboxylase, in normal and hyperglycemic rats. *Afr J Pharm Pharmacol*, 5, 792-796.
 17. Kataki MS., Murugamani V., Rajkumari A., Singh P., Mehra DA., Yadav RS., 2012. Antioxidant, hepatoprotective, and anthelmintic activities of methanol extract of *Urticadioica* L. leaves. *Pharm Crop*, 3, 38-46.
 18. Sen A., Yuksel M., Bulut G., Bitis L., Ercan F., Ozyilmaz-Yay N., Akbulut O., Cobanoğlu H., Ozkan S., Sener G., 2017. Therapeutic potential of *Myrtus communis* subsp. *communis* extract against acetic acid-induced colonic inflammation in rats. *J Food Biochem*, 41, e12297.
 19. Ghaima KK., Hashim NM., Ali SA., 2013. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *J Appl Pharm Sci*, 3, 96.
 20. Cherrat L., Espina L., Bakkali M., Garcia-Gonzalo D., Pagan R., Laglaoui A., 2014. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *J Sci Food Agric*, 94, 1197-1204.
 21. Benkhayal FA., El-Ageeli WH., Ramesh S., Farghamd M., 2009. Antihyperglycaemic effects of volatile oils extracted from *Rosemarinus officinalis* and *Artemisia cinae* in diabetic rats. *Tamilnadu J Vet Anim Sci*, 5, 216-218.
 22. Mohamadi Saei M., Beiranvand K., Khalesi MK., Mehrabi F., 2016. Effects of dietary savory and myrtle essential oils on growth, survival, nutritional indices, serum biochemistry, and Hematology of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. *J World Aquacult Soc*, 47, 779-785.
 23. Eloff JNA., 1998. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, 64, 711-713.
 24. Chollet J., Martrenchar A., Bouchel D., Njoya A., 1994. Epidemiologie des parasitoses digestives des jeunes bovins dans le Nord-Cameroun. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 47, 365-374.
 25. Coles G., Bauer C., Borgsteede F., Geerts S., Klei T., Taylor M., Waller PJ., 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*, 44, 35-44.
 26. Wabo JP., Bilong CB., Mpoame M., 2010. In vitro nematicidal activity of extracts of *Canthium mannii* (Rubiaceae), on different life-cycle stages of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda, Heligmosomatidae). *J Helminthol*, 84, 156-165.
 27. Wabo PJ., Bilong CB., Mpoame M., Ngwa CF., Coles C., 2006. In vitro activity of ethanol, cold and hot water extracts of the stem bark of *Canthium mannii* (Rubiaceae) on *Ancylostoma caninum* eggs. *East Cent Afr J Pharma Sci*, 9, 14-18.
 28. Smyth JD., 1996. *Animal Parasitology*, 3rd ed. London, UK: Cambridge University Press.
 29. Morrison AA., Mitchell S., Mearns R., Richards I., Matthews JB., Bartley DJ., 2014. Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. *Vet Res*,

- 45, 116.
30. Waller PJ., Bernes G., Thamsborg SM., Sukura A., Richter SH., Ingebrigtsen K., Höglund J., 2001. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Vet Scand*, 42, 31.
 31. Torres-Acosta JFJ., Hoste H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin Res*, 77, 159-173.
 32. Athanasiadou S., Houdijk J., Kyriazakis I., 2008. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. *Small Rumin Res*, 76, 2-11.
 33. Cheng G., Hao H., Xie S., Wang X., Dai M., Huang L., Yuan Z., 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Front microbiol*, 5, 217.
 34. Molan AL., Alexander RA., Brookes IM., McNabb WC., 2000. Effects of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes in vitro. In *Proceedings of the New Zealand Soc Anim Product*, 60, 21-25.
 35. Daoudi A., Sabiri M., Bammou M., Zair T., Ibjibijen J., Nassiri L., 2015. Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poir et *Urtica pilulifera* L. *J Appl Biosci*, 87, 8094-8104.
 36. Kalmobe J., Ndjonka D., Boursou D., Vildina JD., Liebau E., 2017. Phytochemical analysis and in vitro anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complement Altern Med*, 17, 404.
 37. Al-Shaibani IRM., Phulan MS., Arijo A., Qureshi TA., 2008. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep in vitro. *Pak Vet J*, 28, 79-83.
 38. Suteky T., Dwatmadji T., 2011. Anthelmintic activity of *Melastomamalabatricum* extract on *Haemonchus contortus* activity in vitro. *Asian J Pharm Clinical Res*, 4, 68-70.
 39. Tiwari P., Kumar B., Kumar M., Kaur M., Debnath J., Sharma P., 2011. Comparative anthelmintic activity of aqueous and ethanolic stem extract of *Tinospora cordifolia*. *Int J Drug Devev Res*, 3, 70-83.
 40. Mohammedi Z., Atik F., 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Int J Pharma Bio Sci*, 2, 209-215.
 41. Bimakr M., Rahman A., Taip FS., Ganjloo A., Salleh LM., Selamat J., Hamid A., Zaidull SM., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod Process*, 89, 67-72.
 42. Dai J., Mumper RJ., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
 43. Hernandez-Villegas MM., Borges-Argaez R., Rodriguez-Vivas RI., Torres-Acosta JFJ., Mendez-Gonzalez M., Caceres-Farfan M., 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*, 179, 100-106.
 44. Ferreira LE., Castro PMN., Chagas ACS., França SC., Belebani RO., 2013. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Exp Parasitol*, 134, 327-332.
 45. Cala AC., Chagas ACS., Oliveira MCS., Matos AP., Borges LMF., Sousa LAD., Souza FA., Oliveira GP., 2012. In vitro anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. *Exp Parasitol*, 130, 98-102.

46. Maciel MV., Morais SM., Bevilaqua CML., Camurça-Vasconcelos ALF., Costa CTC., Castro CMS., 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*, 140, 98-104.
47. Adiele RC., Fakae BB., Isuzu IU., 2013. Anthelmintic activity of *Securidaca longepedunculata* (Family: Polygalaceae) root extract in mice, in vitro and in vivo. *Asian Pac J Trop Med*, 6, 841-846.
48. Brunet S., Jackson F., Hoste H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int J Parasitol*, 38, 783-790.
49. Minho AP., Bueno ICDS., Louvandini H., Jackson F., Gennari SM., Abdalla AL., 2008. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Anim Feed Sci Technol*, 147, 172-181.
50. Minho AP., Filippesen LF., Amarante AFTD., Abdalla AL., 2010. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Cienc Rural*, 40, 1360-1365.
51. Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg SM., Hoskin SO., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol*, 22, 253-261.
52. Ademola IO., Akanbi AI., Idowu SO., 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharma Biol*, 43, 599-604.
53. Bouterfas K., Mehdadi Z., Elaoufi MM., Latreche A., Benchiha W., 2016. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linne) from three geographical origins. *Ann Pharm Fr*, 75, 453-462.
54. Wabo Pone J., Fossi Tankoua O., Yondo J., Komtangi MC., Mbida M., Bilong CF., 2011. The in vitro effects of aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) on three life cycle stages of the parasitic nematode *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda: Heligmosomatidae). *Vet Med Int*, 140293.
55. Cabardo JrDE., Portugaliza HP., 2017. Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. *Int J Vet Sci Med*, 5, 30-34.
56. Engstrom MT., Karonen M., Ahern JR., Baert N., Payre B., Hoste H., Salminen JP., 2016. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their in vitro activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *J Agric Food Chem*, 64, 840-851.
57. Chartier C., Itard J., Morel PC., Troncy PM., 2000. *Manual of the tropical veterinary parasitology*. Ed Tec et Doc. London, p. 771.
58. Hagerman AE., Robbins CT., Weerasuriya Y., Wilson TC., McArthur C., 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *J Range Manag*, 45, 57-62.
59. Jean-Blain C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev Med Vet*, 149, 911-920.
60. Horigome T., Kumar R., Okamoto K., 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *Br J Nut*, 60, 275-285.
61. Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F., Coop RL., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol*, 99, 205-219.



Karatavukta (*Turdus merula*) Neurocranium'un Makro–Anatomik Olarak İncelenmesi*

Caner BAYRAM^{1a}, Derviş ÖZDEMİR^{1b}✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-1709-6638^a, 0000-0002-6038-0485^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
13.02.2019	12.05.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Bayram C, Özdemir D: Karatavukta (*Turdus merula*) Neurocranium'un Makro–Anatomik Olarak İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 284-289, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.526726

Öz: Kuşlarda, baş iskeletini oluşturan kemiklerin, omurgalı canlılar grubu içerisinde en fazla çeşitliliğe sahip olması; ossa cranii'nin makro- anatomik açıdan önemini artırmaktadır. Bu kapsamda, karatavuk (*Turdus merula*) kuşunda neurocranium makro- anatomik olarak incelenerek, bu alandaki bilgi eksikliğinin giderilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Araştırmada cinsiyet ayırımına bakılmaksızın yetişkin; yedi adet erkek ile beş adet dişi karatavuk kuşunun kafatasları masere edilerek makro- anatomik olarak incelendi. İncelenen materyallerin 50 mm'lik klasik büyüteç altında farklı açılardan görüntüleri alındı. Karatavuk kuşunda; kafa kemikleri arasında sutura'ların bulunmadığı ve aegithognath tipte kafatası yapısına sahip oldukları belirlendi. Neurocranium'un; os occipitale, os sphenoidale, os parietale, os frontale ve os temporale'den oluştuğu; os ethmoidale'nin ise orbita'nın baskısıyla splanchnocranium kısmına dâhil olduğu gözlemlendi. Üçgen şeklinde olan os sphenoidale'nin, cavum cranii'nin ventral parçasının büyük bir kısmını oluşturduğu saptandı. Cavum cranii'nin lateral duvarının oluşmasında ise os temporale'nin önemli rol oynadığı belirlendi. Sonuç olarak; bu çalışmada elde edilen verilerin bu alanda bilgi eksikliğine katkı sağlayacağı ve sistematik alanda çalışan araştırmacılar için de taksonomide faydalanacakları bir kaynak olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kafatası, Karatavuk, Neurocranium, Ossa cranii, *Turdus merula*.

Macro- Anatomical Examination of the Neurocranium in The Blackbird (*Turdus merula*)

Abstract: Macro-anatomical importance of ossa cranii is increasing since the bones that make up the head skeleton in birds have the greatest diversity in the vertebrate group. Within this scope, macro- anatomical examination of the neurocranium in blackbird will contribute to the elimination of the lack of information in this area. In this research, regardless of gender, skulls of seven male and five female adult blackbirds were examined macro-anatomically by maceration. Images of materials examined were taken from different angles under 50 mm classical magnifying glass. It is determined that blackbirds have no suturas between their skull bones and have aegithognath type skull structure. It was observed that neurocranium is composed of occipital, sphenoid, parietal, frontal and temporal bone; also, ethmoid bone was included in the splanchnocranium part by the pressure of orbita. It was found that the triangular sphenoid bone forms a large part of the ventral part of the cavum cranii. As a result; It was concluded that the data obtained in this study will contribute to the lack of information in this field and it may be a source that will be used in taxonomy for the researchers working in the systematic area.

Keywords: Blackbird, Neurocranium, Ossa cranii, Skull, *Turdus merula*.

✉ Derviş Özdemir

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: dozdemir@atauni.edu.tr

*Caner BAYRAM'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Karatavuk (*Turdus merula*) kuşunun da içerisinde yer aldığı kuşların sayısı bakımından en kalabalık takımını oluşturan *Passeriformes* (*Passeres* = Ötücü Kuşlar) takımı, yaşamakta olan kuşların %60'ını içerir (1-5). Fosil ve nesli tükenenler de içinde olmak üzere tüm tespit edilmiş kuşların ise %50'den fazlasını oluşturur (2). Bu takıma ait bulunmuş en eski fosil kuş; Amerika'da Miyosen tabakalarında saptanan *Paleospiza* türüdür (1,2).

Kuşlarda kafatası tipleri; palaeognath, schizognath, desmognath, aegithognath olmak üzere dört çeşittir ve bu tiplerin sadece bir tanesinin bir takımında görülmesinden dolayı taksonomik çalışmalarda da kullanılmaktadır (1).

Kuşlarda neurocranium kemikleri, memelilerde olduğu gibi; os occipitale, os sphenoidale, os ethmoidale, os parietale, os frontale ve os temporale'den oluşur (6-8). Memelilerden farklı olarak; os interparietale bulunmaz (6). Os ethmoidale ise orbital bölgenin oldukça büyük olması nedeniyle nasal kısma çok yakın bulunur (6-8) ve bu kemik neurocranium içerisine dahil edilmez (6).

Kuşların sınıflandırılmasında ve cinsiyetinin saptanmasında ossa cranii önemli bir yere sahiptir (6,9). Kuşlarda kafa iskeletini oluşturan kemiklerin omurgalı canlılar grubu içerisinde en fazla çeşitlilik göstermesi, kuşlarda kafatası kemiklerinin önemini artırmaktadır. Yapılan bu çalışma ile karatavuk kuşunun kafatası kemikleri makro-anatomik olarak incelenerek bu alandaki bilgi eksikliğinin giderilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada, Giresun İli'nin Dereli İlçe'sine bağlı Meşeliyatak Köyü'ndeki arazide çeşitli sebeplerden dolayı ölü olarak bulunan yetişkin karatavuk (*Turdus merula*) kuşları (yedi tane erkek, beş tane de dişi) kullanıldı. Çalışmada 5-5.2 cm boyutundaki cranium'lar cinsiyet ayrımı gözetmeksizin incelendi. Kafataslarının maserasyonları literatürde (10) belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Daha sonra

formolsüz olarak 500 ml'lik beher kabı içerisine 50 ml soda (NaHCO_3) ilave edilerek geri kalan kısmı su ile tamamlandı ve kaynamaya bırakıldı. Kaynama sırasında, kemiklerin, tüy ve etlerden preperasını kolaylaştıran ısı işlemi sonucunda kemiklerin zarar görmemesi için 2 saatlik kaynatma işlemi uygulandı. Bu süreçte sık sık kontroller yapılarak istenilen kıvamda ısı işlemi tamamlandıktan sonra, suyu süzülür ve daha sonrasında dikkatli bir diseksiyon çalışmasıyla oldukça hassas olan cranium kemiklerine zarar verilmeden; bistüri, dişli pens ve kancalı iğne gibi aletler yardımı ile prepare edildi. Prepare edilen cranium'lar daha sonra maserasyonu tamamlamak üzere; %10 NaHCO_3 ile aynı oranda sabun içeren içi su dolu beher kabı içerisine konularak 3 gün süre ile bekletildikten sonra çıkarılıp güneşte tamamen kurutularak çalışma için hazır hale getirildi.

Makro- anatomik olarak incelenen cranium kemiklerinin daha sonra 50 mm'lik klasik büyüteç yardımıyla çeşitli açılardan fotoğrafları çekildi. Terminolojik ifadelerin yazılımında Nomina Anatomica Avium (NAA) esas alındı (11). Çalışma için gerekli izin Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Etik Kurul'undan alınmıştır (Tarih: 27.04.2011, Sayı: 2.1/4).

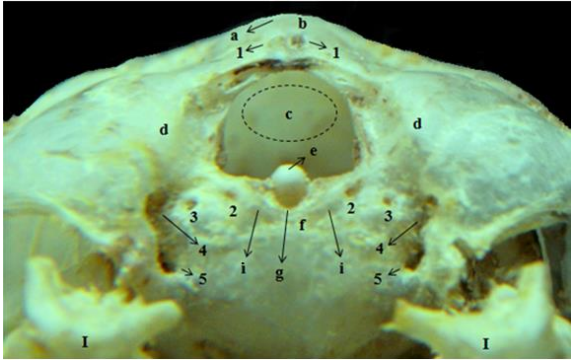
BULGULAR

Neurocranium kemiklerini; os occipitale, os sphenoidale, os parietale, os frontale, os temporale ile ethmoidale'nin oluşturduğu tespit edildi. Kafa kemikleri arasında sutura'ların bulunmadığı ve condylus occipitalis'in tek çıkıntı şeklinde olduğu belirlendi.

Os occipitale

For. magnum'u çevreleyen os basioccipitale, os supraoccipitale ve çift olarak bulunan os exoccipitale'nin os occipitale'yi oluşturdukları gözlemlendi. Kafatasının bazal'inde vertikal şekilde yer alan, atlas ile eklem yapmaya yarayan, tek çıkıntılı, ventral'den görünüşünde tam bir küreye benzeyen

condylus occipitalis; for. magnum, os basioccipitale ve os exoccipitale ile sınırlandırılmıştı. Ventral'den condylus occipitalis'in hemen önünde bulunan fossa subcondylaris ile tuberculum basillare'nin lateral'e bakan dış yüzeyinde canalis n. hypoglossi bulunmaktaydı. Canalis n. hypoglossi'nin medial'inden lateral'e doğru for. n. vagi ve ostium canalis ophthalmici externi ile ostium canalis ophthalmici externi'nin rostral'inde de ostium canalis carotici'nin yer aldığı tespit edildi. For. magnum ile os parietale arasında yer alan os supra occipitale'nin üst kısmından enine uzanan crista nuchalis transversalis ile prominentia cerebellaris'in belirgin olduğu ayrıca sağ ve sol olarak bulunan fonticulus ile for. magnum ve os supra occipitale arasında çift halde yer alan for. venum occipitalis externae belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Karatavukta os occipitale'nin ventral'den görünümü.

Figure 1. Ventral view of os occipitale in blackbird.

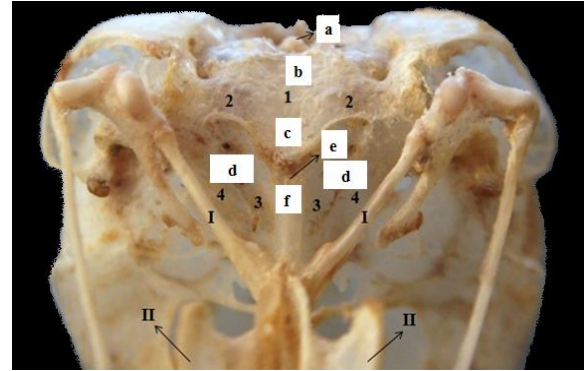
1. For. venum occipitalis externae. 2. Canalis nn. hypoglossi. 3. For. n. vagi. 4. Ostium canalis ophthalmici externi. 5. Ostium canalis carotici. a. prominentia cerebellaris. b. Os supraoccipitale. c. For. magnum. d. Os exoccipitale. e. Condylus occipitalis. f. Os basioccipitale. g. Fossa subcondylaris. i. Tuberculum basillaris. I. Mandibula.

Os sphenoidale

Os sphenoidale üçgen şeklindeydi ve cranial'de os palatinum ile os pterygoideum ve os ethmoidale; caudal'de os occipitale; lateral'de ise os temporale kemikleri ile komşuluklarının olduğu ve dolayısıyla cavum cranii'nin ventral parçasının büyük bir bölümünü oluşturdukları tespit edildi.

Basisphenoidale ile presphenoidale olmak üzere iki kısımdan oluşan, üçgene benzeyen os

sphenoidale'nin; kabaca eşkenar bir üçgenin ağırlık merkezinden taban bölümüne kadar olan kısmının yani caudal tarafa doğru olan bölümünün basisphenoidale'ye karşılık geldiği görüldü. Basisphenoidale'nin median'da çıkıntı şeklindeki corpus ve her iki yanındaki ala temporalis'ten oluştuğu belirlendi. Kurgulanan üçgenin ağırlık merkezinden tepe noktasına doğru yani cranial tarafa doğru olan bölümü ise presphenoidale'ye karşılık gelmekteydi. Presphenoidale'nin, bir corpus ile iki ala orbitalis'ten oluştuğu gözlemlendi. Benzerlik kurulan üçgenin ağırlık merkezinin ise yaklaşık olarak corpus bölgesine denk geldiği ve bu kısımda os pterygoideum ve os palatinum ile bağlantılı oldukları, ayrıca tepe noktasına doğru os ethmoidale ile birleştikleri tespit edildi. Os ethmoidale'nin vertikal parçası ile birleşen presphenoidale'nin ala orbitalis'leri corpus kısmından cranial kısma doğru ilerlediği ve septum interorbitale'yi meydana getirdiği belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Karatavukta os sphenoidale'nin ventral'den görünümü.

Figure 2. Ventral view of os sphenoidale in blackbird.

a. Condylus occipitalis. b. Os basioccipitale. c. Os basisphenoidale. d. Os laterosphenoidale. e. Tuba auditiva communis. f. Os sphenoidale. I. Os pterygoideum. II. Os palatinum. 1. Lamina parasphenoidalis. 2. Ala parasphenoidalis. 3. Ala orbitalis. 4. Ala temporalis.

Os parietale

Os temporale ile os frontale arasında yer alan os parietale'nin; caudalde os supraoccipitale ve prominentia cerebellaris ile komşuluğu saptandı. Kafatası tavanının caudal kısmının karşılıklı lateral

bölümünü kaplayan bu kemiğin karatavuk kuşunda dorsal'de yer aldığı ve dorsal yüzünün konveks olduğu ayrıca os interparietale kısmının bulunmadığı gözlemlendi (Şekil 3).

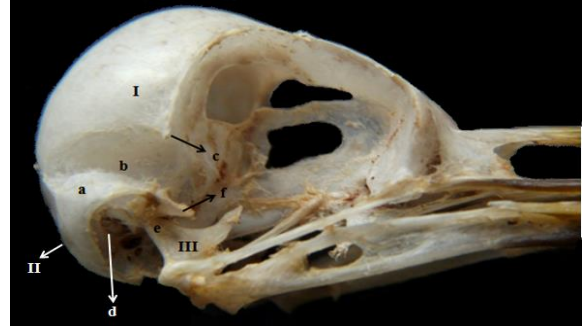


Şekil 3. Karatavukta os parietale'nin dorsal'den görünümü.

Figure 3. Dorsal view of os parietale in blackbird. I. Os parietale. II. Os frontale. a. Os supraoccipitale. b. Prominentia cerebellaris.

Os temporale

Os temporale'nin, os oticum ve pars squamosa parçalarının kaynaşmasıyla, karşılıklı olarak cavum cranii'nin lateral duvarını şekillendirdikleri görüldü. Cranium'un iç kısmına kadar ilerleyen os oticum; os basisphenoidale, os parietale ve os exoccipitale kemiklerinin arasında bulunmaktaydı. Ayrıca; porus acusticus externus'un oldukça büyük bir şekilde yer aldığı gözlemlendi. Cranium'un lateral duvarının oluşumuna katılan os temporale'nin diğer bir parçası olan pars squamosa, fossa temporalis'i oluşturduğu ve bu çukuru rostral kısmı ile os parietale arasında proc. postorbitalis'in bulunduğu tespit edildi. Ayrıca pars squamosa kısmında; os quadratum ile eklem yapan bir eklem çukuru ve buranın ön kısmında proc. oticus ile buranın dorsal'ine karşılık gelecek şekilde; pars squamosa'nın cranial'inde proc. squamosalis'in varlığı gözlemlendi (Şekil 4).



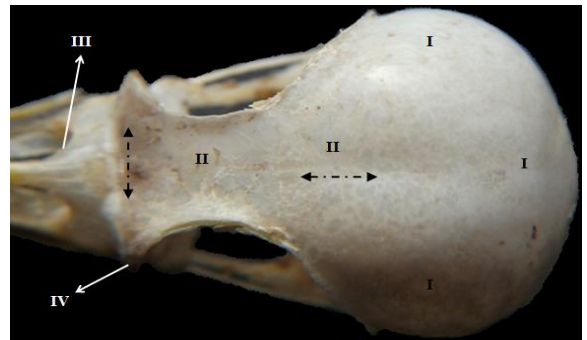
Şekil 4. Karatavukta os temporale'nin lateral'den görünümü.

Figure 4. Lateral view of temporale in blackbird. I. Os parietale. II. Os exoccipitale. III. Os quadratum a. Squama temporalis. b. Fossa temporalis. c. Processus postorbitalis. d. Porus acusticus externus e. Processus oticus. f. Processus squamosalis.

Os frontale

Cavum cranii'nin tavanını oluşturan os frontale'nin, orbita ve cavum nasi'nin meydana gelmesinde rol aldığı tespit edildi. Os frontale'nin; pars orbitalis, pars frontalis ve pars nasalis olmak üzere üç parçadan şekillendiği gözlemlendi. Kafatasına oranla geniş bir şekle sahip olduğu görülen bu kemiğin; pars frontalis kısmında medial olarak belirgin bir oluk yer aldığı ayrıca pars nasalis kısmında da çukur kısmı iyi görünmekteydi.

Os frontale'nin; önde os lacrimale, cranial'de os nasale, arkada os parietale ve os ethmoidale ile bağlantılı oldukları belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Karatavukta os frontale'nin dorsal'den görünümü.

Figure 5. Dorsal view of os frontale in blackbird. I. Os parietale. II. Os frontale. III. Os nasale. IV. Os lacrimale.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kuşlarda kafa kemikleri, memelilerdeki gibi kafatası neurocranium ve sphanchnocranium olarak iki bölümde incelenmektedir. Neurocranium'un; os occipitale, os sphenoidale, os ethmoidale, os parietale, os frontale ve os temporale'den oluştuğu fakat os ethmoidale'nin orbital bölgenin baskısıyla nasal kısma yaklaştığı ve neurocranium içerisine dahil edilmediği bilgilerinin (6-8), çalışmada kullanılan karatavuk kuşu için de geçerli olduğu gözlemlendi.

Literatür (6-8) bilgileriyle örtüşen, os occipitale'nin foramen magnum'u kapsayacak biçimde yer aldığı görüldü. Tavukta foramen magnum'un üçgene benzer bir şekilde (12), güvercinde basal ve horizontal, gri balıkcıl kuşunda (13) vertikal, ördek ve kazda nuchal bölgede ve vertical (8), kelaynakta oblik ve caudoventral (14), beç tavuğu ve hindide ise vertical ve nuchal olarak yer aldığı (15), bir başka literatürde (15) hindide hafifçe vertikal ve oval şekilli olduğu belirtilmiştir. Karatavuk kuşunda ise tavukta görülen tipe benzer şekilde, iki tür arası bir konumda olduğu görüldü.

Cavum cranii'nin ventral kısmının büyük bir bölümünü şekillendiren üçgen şeklindeki os sphenoidale'nin, yapılan çalışmada literatür bilgileriyle (6-8,17,18) örtüştüğü ve üçgene benzeyen konumu ile eşkenar üçgen gibi değerlendirme yöntemiyle analitik olarak incelemeyi kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Bu kapsamda eşkenar üçgenin ağırlık merkezi ile taban kısmı arasındaki caudal'e dönük bölgesini basisphenoidale'ye, ağırlık merkezini corpus bölgesine ve benzetilen üçgenin ağırlık merkezi ile tepe noktası arasında kalan cranial'e dönük bölgenin ise presphenoidale ile eşleştirilerek bu kemiğin bölümleri daha rahat ayırt edilebilir. İncelemeler sonucunda; literatürde (6,17,18); ördek, kaz, balaban ve çamurcun kuşlarındaki basisphenoidale bölgesi üzerinde görülen kas kabartıları, karatavuk kuşunda da hafif şekilde görüldü. Presphenoidale bölgesinin septum interorbitale'nin oluşumunda rol oynadığı (6,17,18), bu çalışma için de geçerli olduğu saptandı.

Os ethmoidale'nin, orbita'nın genişlemiş yapısı sonucu öne doğru itilerek neurocranium kapsamı dışında olduğu (6-8), karatavuk kuşunda da gözlemlendi. Ayrıca, os ethmoidale'nin ventral bölümünün lateral'inde; oval ve körelmiş bir şekilde yer alan proc. ethmoidalis'in varlığı tespit edildi.

Os parietale'nin; çamurcun, balaban ve kızılşahin kuşlarında dorsal yüzlerinin konveks olduğu bilgisinin (6-8,17,18) karatavuk kuşu için de geçerli olduğu görüldü. Ayrıca bu kemiğin kızılşahinde caudal'de, balaban kuşunda ise dorsal'de yer aldığı bildirilmektedir (6-8,17,18). Karatavuk kuşunda ise; os parietale'nin balaban kuşuna benzerlik gösterdiği ve dorsal'de yer aldığı tespit edildi. Literatürde (6-8,17,18) belirtildiği gibi os interparietale karatavuk kuşunda da görülmedi. Balaban kuşunda (18), os parietale kemikleri arasında bulunan crista'nın, karatavuk kuşunun os parietale kemikleri arasında bulunmadığı belirlendi.

Os temporale'nin pars squamosa bölümünde, os quadratum ile eklemleşmeye özgü bir eklem çukuru ile buranın ön kısmında yer alan proc. oticus'un literatürde (6-8) kazlarda güçlü, ördekte uzun, tavuklarda ise kısa ve ince bir yapıda olduğu bildirilen bu çıkıntının, karatavuk kuşunda ise tavukta olduğu gibi kısa, ince ve ayrıca horizontal bir şekilde olduğu görüldü. Pars squamosa'nın cranial'inde proc. squamosalis adı verilen çıkıntı tespit edildi.

Os frontale'nin yapılan araştırmalarda (17,18); balabanda uzun ve ince, kızıl şahin ile çamurcunda geniş bir şekilde olduğu bildirilmektedir. Karatavuk kuşunda ise benzer şekilde kafatasına oranla geniş bir şekilde yer aldığı görüldü. Ayrıca literatürde (17,18), pars frontalis kısmında medial olarak belirgin bir oluşun yer aldığı bilgisinin, bu çalışma için de geçerli olduğu, bununla birlikte pars nasalis kısmında da çukur kısmın belirginliği tespit edildi. Beç tavuğunda (6-8) görülen ibiğin taşınmasına özgü, pars frontalis'te sutura sagittalis yakınında median şekilde yer alan hafif tümsek kemik bir kısmın varlığı; yapılan çalışmada karatavuk kuşunda ibik olmadığından böyle bir oluşumun izine rastlanmadı. Kızıl şahin (19), Güney dev fırtınakuşunda (20), kahverengi bubu

kuşunda (21) ve gri balıkcıl kuşunda (22) oldukça belirgin olan os prefrontalis'in, karatavuk kuşunda belirgin olmadığı saptandı.

Sonuç olarak; Kuş sistematigi üzerine çalışan araştırmacıların türler arası karşılaştırmaların belirlenmesinde çalışmanın rol alacağı ve fikir kazandıracığı kanaatine varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Demirsoy A., 2003. Yaşamın Temel Kuralları Omurgalılar/ Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler). 5. Baskı, Meteksan Yayınevi, 199-407, Ankara.
- Kuru M., 2006. Omurgalı Hayvanlar. 8. Baskı, Palme Yayıncılık, 425-475, Ankara.
- Afyon A., Kaya MA., Yağız D., 2009. Genel Biyoloji, Canlılar Bilimi. 3. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 51-52, Ankara.
- Kızıroğlu İ., 2001. Doğal bir kuş müzesi olan Türkiye'deki kuş grupları, Popüler Bilim, 49-54.
- Ergene S., 1945. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Monografileri, Türkiye Kuşları, Kenan Matbaası, 216-246, İstanbul.
- Dursun N., 2014. Evcil Kuşların Anatomisi (Hareket Sistemi), Medisan Yayınları, Ankara.
- Baum EV., 1964. Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Haustiere. Çeviri: Doğuer S, Erençin Z. Evcil Kuşların Komparativ Anatomisi, Ankara.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E., 1977. Anatomy of the Domestic Birds. Verlag Paul Parey, 5-25, Berlin.
- Koch T., Rossa E., 1973. Anatomy of the Chicken and Domestic Birds. The Iowa State University Press, Ames. Iowa.
- Taşbaş M., Tecirlioğlu S., 1996. Maserasyon tekniği üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Vet Fak Derg, 12, 324-330.
- Baumel JJ., Witmer LM., 1993. Nomina Anatomica Avium. 2nd Edition, Massachusetts, 45-132, Nuttall Ornithological Club, Harvard University.
- McLelland J., 1990. A Color Atlas of Avian Anatomy. Wolfe Publishing Ltd, London.
- Atalgın ŞH., Büyükçopur EÜB., Kürtül İ., 2014. A detailed evaluation of the skeletal elements of the skull in the grey heron (*Ardea cinerea*). Turk J Vet Anim Sci, 38, 370-376.
- Çakır A., 2001. Kelaynak kuşunda (*Geronticus eremita*) neurocranium kemikleri. Türk Vet Hek Bir Derg, 72, 35-38.
- İlgün R., Özkan ZE., Akbulut Y., 2017. Tepeli pelikanların (*Pelecanus crispus*) neurocranium ve splanchnocranium kemikleri üzerinde makro-anatomik incelemeler. Van Vet J, 28, 5-10.
- Süzer B., Serbest A., Arıcan İ., Yonkova P., Yılmaz B., 2018. A morphometric study on the skull of the turkeys (*Meleagris gallopavo*). Uludağ Univ J Fac Vet Med, 37, 93-100.
- Can M., Özdemir D., Özüdoğru Z., 2010. Çamurcun (*Anas crecca*) İskelet sistemi üzerinde makro- anatomik araştırmalar I. Skeleton axiale. Fırat Üniversitesi Sağ Bil Derg, 24, 123-127.
- Özdemir D., Özüdoğru Z., Can M., Sunar M., 2009. Balaban (*Botaurus stellaris*) ve kızıl şahin (*Buteo rufinus*) neurocranium'u üzerinde karşılaştırmalı makro-anatomik incelemeler. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 4(3), 177- 183.
- Orhan Ol., Ozgel O., Kabak M., 2002. Kızıl şahinde (*Buteo rufinus*) neurocranium kemikleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 49, 153-157.
- Piro A., Hospitaleche AC., 2019. Skull morphology and ontogenetic variation of the Southern Giant Petrel *Macronectes giganteus* (Aves: Procellariiformes). Polar Biology, 42, 27-45.
- Carlos C., Alvarenga J., Mazzochi M., 2017. Osteology of the feeding apparatus of Magnificent Frigatebird *Fregata magnificens* and Brown Booby *Sula leucogaster* (Aves: Suliformes). Papeis Avulsos De Zool, 57, 265-274.
- Bavdek SV., Golob Z., Janzekovic FCS., Kubale V., 2017. Skull of the grey heron (*Ardea cinerea*): Detailed investigation of the orbital region. Anat Histol Embryol, 46, 552-557.



Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması*

Nuket KAMIŞ^{1a}, Funda KARABAĞ ÇOBAN^{2b}✉

1. Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
2. Uşak Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-3624-347X^a, 0000-0002-1565-32101^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.04.2019	09.09.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kamiş N, Karabağ Çoban F: Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 290-298, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.552207.

Öz: Parasetamol ucuz olması, kolay bulunabilmesi bakımından sık kullanılan ağrı kesici, ateş düşürücü etkisi olan bir ilaçtır. Parasetamol, karaciğerde metabolize olmaktadır. Yüksek dozda parasetamol karaciğer hasarına (hepatotoksisite) neden olmaktadır. Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE); antimikrobik, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip bir bileşendir. Uzun aromatik ve alifatik yapıdaki karbonları olmasından dolayı hücre duvarından kolayca geçer ve etki edeceği bölgeye daha rahat ulaşır. Bu çalışmanın amacı ratlara parasetamol ile hepatotoksisite oluşturulup meydana gelebilecek oksidatif stres ve enflamasyon üzerine CAPE'nin koruyucu etkisini araştırmak için tasarlanmıştır. Sunulan çalışmada, 36 wistar erkek rat kullanıldı. Rastgele olacak şekilde altı gruba ayrıldı; kontrol grubu; sadece yem verildi, parasetamol grubu; 2 g/kg parasetamol, parasetamol+CAPE grubu; 2 g/kg parasetamol+ 10 µg/kg CAPE, parasetamol+NAC grubu; parasetamol 2 g/kg + NAC (140 mg/kg) ve 140 mg/kg N-Asetilsistein 1 saat sonrasında da 2g/kg dozunda, 2 ml parasetamol, CAPE grubu; 10 mikrogram/kg CAPE ve etanol grubu; CAPE'nin çözdürüldüğü oranda seyreltik etanol. Veriler istatistiksel olarak SPSS-18 ANOVA ile standart sapma olarak değerlendirilmiştir. P<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, parasetamol indüklü hepatotoksisite modelinde kontrol grubuna göre parasetamol grubunda oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı (P<0.05), CAPE verilen grupla parasetamol grubu karşılaştırıldığında, CAPE'nin meydana gelen enflamasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Keywords: CAPE, Hepatotoksisite, Oksidatif stres, Parasetamol, Rat.

Investigation of Caffeic Acid Phenethyl Ester Effect on Inflammation and Oxidative Stress in Paracetamol Induced Hepatotoxicity

Abstract: Paracetamol is a cheap, pain-relieving, fever-reducing medicine that can be easily found. Paracetamol is metabolized in the liver. At high doses, paracetamol causes liver damage which is called hepatotoxicity. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) has antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. Due to its long aromatic and aliphatic carbon structure, it passes easily through the cell wall and reaches the region where it will act more easily. The aim of this study is to understand the CAPE protective effect to hepatotoxicity oxidative stress and inflammation during the application of paracetamol. In this study 36 wistar rat was used and they were divided into six groups randomly. Control: given only forage. Paracetamol; 2 g/kg dose of paracetamol. Paracetamol +CAPE; 2 g/kg dose of paracetamol + 10 µg/kg CAPE. Paracetamol + NAC; Paracetamol 2 g/kg + NAC (140 mg/kg); 140 mg/kg N-asetil Sistein applied after one hour 2 g/kg dose of 2 ml paracetamol. CAPE:10 microgram/kg CAPE and ethanol group. The data is analyzed statistically SpSS-18 ANOVA standard variation. P<0.05 is accepted meaningful. According to the results obtained, it is seen that hepatotoxicity induced paracetamol model has more oxidative stress statistically than the control group (P<0.05). The groups which were given CAPE and paracetamol group when compared, CAPE has protective effect to the occurring inflammation.

Anahtar Kelimeler: CAPE, Hepatotoxicity, Oxidative stres, Paracetamol, Rat.

✉ Funda Karabağ Çoban

Uşak Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
e-mail: funda.karabag@usak.edu.tr

*Uşak Üniversitesi 2017/TP035 no'lu BAP tez projesi olarak onaylanmıştır.

GİRİŞ

Karaciğer, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizma ve detoksifikasyonundan sorumlu ana organ olması nedeniyle özellikle ilaçların neden olduğu toksisitede başlıca hedef organdır. Sadece ilaçlar değil bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri de karaciğer hasarına neden olabilir. Bu tip hepatotoksisite, akut karaciğer yetmezliğine kadar gidebilen ağır karaciğer hasarına ve sonuçta ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilir. İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı tespit edilmesi zor, çoklu mekanizmalara sahiptir. Parasetamol 1950'den beri klinik olarak kullanılan, ucuz ve kolay ulaşılabilirliğiyle günümüzde ise dünyada en çok kullanılan analjeziktir. 2015 yılından itibaren Türkiye'de 300'den fazla ilaç içerisinde etken madde olarak bulunmaktadır (1).

Parasetamol, kontrollü klinik araştırmalara göre plaseboya benzer yüksek güvenilirliği, düşük yan etki insidansı, düşük ilaç etkileşimi ve reçetesiz temin edilebilmesi sebebi ile yaygın kullanılan bir ilaçtır. Uygun teröpatik dozlarda oldukça güvenli ve kolayca tolere edilebilirdir ancak yüksek tek doz alımlarında, parasetamol insanlarda ve hayvanlarda karaciğer, böbrek ve diğer organlara hasar verebilir (1).

Parasetamolün yüksek dozda kullanılmasına bağlı olarak gerçekleşen toksik olaylarda başlıca antidot olarak N-asetilsistein (NAC) kullanılmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda NAC'ın hepatotoksisiteyi önlediği ve koruyucu etkisi olduğu kanıtlanmıştır (2,3). Fakat NAC'ın verilmesi halinde bile hepatotoksisite meydana gelebilmektedir (4).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) yapı olarak flavonoidler ile benzerliği ile dikkat çeken, bal arılarının bitki özütlerinden toplamış olduğu propolisin aktif bileşenidir (5). Propolis ise bal arıları tarafından üretilen, doğal bir ürün olan ve kovanlarda en bol bulunur, aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal özelliklere sahiptir

(6,7,8). Sitokinler, immün cevabın başlangıcında görevli olan hücresel düzenleyici proteinlerdir. Literatürde CAPE'nin ve NAC'ın koruyucu etkisinin olduğu çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda, parasetamol hepatotoksikasyonu veya CAPE'nin oluşturulan karaciğer hasar modellerinde koruyucu etkisi üzerine yapılan veriler mevcut olsa da, bu çalışma ile deneysel olarak parasetamol hepatotoksitesini oluşturulan ratlarda, AST, ALT, total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS), tümör nekroz faktör (TNF- α), interlökün 18 (IL-18), interlökün 1 beta (IL1 β), katalaz (CAT), Glutasyon (GSH) ve Malondialdehid (MDA) seviyeleri incelenerek oluşan hasar, inflamasyon ve oksidatif stres yönünden değerlendirilmiş, aynı zamanda CAPE'nin oluşan hasara olan etkisi NAC tedavisi ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma, ilgili konu ile yapılan araştırmalara ve araştırmacılara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Deney Hayvanları

Araştırma Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Teknolojik Araştırma Merkezi Laboratuvarı Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda, UŞAK HADYEK, 2017/02-02 no'lu karar ile etik kurulunun onayı ile yapıldı. Hayvanların bakımı AKÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

Çalışmada 2-3 aylık 180-200 gram ağırlığına sahip sağlıklı 36 adet '*Wistar-albino*' erkek rat kullanıldı. Araştırmadan 1 hafta önce gözlem altına alınan deney hayvanlarının deney ortamına adaptasyonu sağlandı. Denekler 12 saat karanlık ortamda, 12 saat aydınlık ortamda kalacak şekilde ve her bir kafeste 6 rat olacak şekilde ayrıldı. Çalışma

süresince tüm denekler eşit ortam koşullarında tutuldu. Deneklere çalışma süreleri boyunca standart rat yemi ve su 'ad libitum' olarak verildi. Yem verme işlemi iki kere olmak üzere 09.00 ile 19.00 saatlerinde yapıldı.

Kimyasalların Uygulanması

Çalışmada parasetamol, rat başına 2 g/kg dozu 2 ml'ye tekabül edecek şekilde Phosphate buffer saline'nin (PBS) %1'lik Karboksi Metil Selüloz (CMC) çözeltisinde süspanse edilerek hazırlandı. Hazırlanan süspanسیون gastrik gavaj yardımıyla oral yoldan uygulandı. Çalışmada uygulanan parasetamol dozları, ilgili literatüre göre belirlendi (9).

Çalışmada, %0.9'luk NaCl çözeltisinde hazırlanan, 600 mg tek tablet NAC (Mentopin, Hermesarzneimittel GmbH, Münih-Almanya) gavaj yardımıyla oral yoldan verildi.

CAPE, Sigma- Aldrich den temin edildi.

Çalışmada hayvanlara ötenazi için 65 mg/kg ketamin ve 7mg/kg Ksilazin intraperitoneal (ip) olarak verildi.

Deney Gruplarının Oluşturulması

Ratlar her bir grupta rastgele seçilmiş 6 adet rat bulunmak üzere 6 gruba ayrıldı. Ratlara aşağıda belirtilen deney protokolleri uygulandı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=6): Çalışma süresince yalnızca standart yemle ve su ile beslenen ratlardan oluşturuldu.

Grup 2: Parasetamol grubu (n=6): 2g/kg dozunda, 2 ml gavaj ile parasetamol uygulaması yapıldı.

Grup 3: Parasetamol + CAPE (n=6): 2g/kg oral parasetamol uygulaması sonrasında, 10 mikrogram/kg ip. CAPE uygulaması yapıldı.

Grup 4: Parasetamol + NAC (n=6): 140 mg/kg N-AsetilSistein oral yoldan verildikten, 1 saat sonrası 2 g/kg dozunda, 2 ml parasetamol uygulaması yapıldı.

Grup 5: CAPE (n=6): Etanolle çözündürülüp tek başına i.p. 10 mikrogram/kg CAPE uygulaması yapıldı.

Grup 6: Etanol grubu (n=6): CAPE'nin çözündürüldüğü konsantrasyonda etanol ip. olarak uygulandı.

NAC, parasetamol verildikten bir saat ve 12 saat sonra tekrarlandı.

Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu

Karaciğer doku örnekleri, deneyden 1 saat öncesinde -80 °C'den çıkartılıp oda sıcaklığında çözündürüldü. Çözünmesi gerçekleşen örnekler öncelikle hassas terazi ile tartıldı. Tartma işlemi bittikten sonra her bir karaciğer örneklerine 5 ml pH 7.4 olan fosfat tamponu eklenerek ultra turrax doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi bittikten sonra deney tüplerine alındı. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant toplanarak biyokimyasal çalışmalar gerçekleştirildi.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimya tüpüne (jelli antikuaglanırsız tüpler) alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj (Nüve NF 800R, Türkiye) edildi ve elde edilen serum örneği analiz yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Analiz saatinde çözündürülen numunelerden, Uşak Üniversitesi uygulama ve araştırma hastanesi biyokimya laboratuvarında Abbott C4100 markalı entegre otoanalizör biyokimya cihazında AST ve ALT enzim aktiviteleri ölçüldü.

Elde edilen karaciğer doku örneklerinden, Rat TNF- α Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, Lot numarası 201709), Rat IL-1 β Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, lot no: 201709), Rat IL-18 Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, lot no: 201709) kullanılarak sitokin seviyeleri ölçüldü. Yapılan analizlerde kullanılan kitler, standart sandviç enzime bağlı immün-sorbent ölçüm teknolojisine dayanmaktadır. Standartlara ve ölçülecek olan numuneler 450 nm absorbansda okutulur, sonuçlar konsantrasyon olarak hesap edilir.

Ayrıca TAS seviyeleri Rel Assay Diagnostic/Konya, (lot no: DR16069A) ve TOS Rel Assay Diagnostic/Konya, (lot no: DR160800) kitleri ile ölçüldü. TAS ölçümünün prensibi, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalini antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. TOS ölçümünün prensibi, örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanır.

Karaciğer MDA ölçümünde Sushil (10) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA aerobik şartlarda pH 3.4 de tiyobarbitürik asit ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanmış olur.

CAT enzim seviyeleri SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak yapıldı, sonuçlar ng/ml olarak verildi. GSH seviyeleri, SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak yapıldı sonuçlar ng/ml olarak verildi, SOD ölçümleri ise, SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak ölçüldü sonuçlar nmol/ml olarak verildi. SOD, GSH ve CAT ölçümleri için kullanılan kitler, sandviç enzim immunoassay yöntemi kullanarak in vitro kantitatif ölçüm yapan ELISA kitleridir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences vers. 18.0, SPSS inc, Chicago illinois, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırmada ANOVA ve Duncan testi kullanıldı. P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

24 saatlik çalışma sonunda ratlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinden, TNF- α , IL 1 β , IL 18, TOS, TAS, düzeyleri, MDA, SOD, GSH ve CAT doku seviyeleri, serum AST ve ALT analizleri yapılmıştır. Gruplar kendi aralarında aynı zamanda kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

Serum AST ve ALT Aktiviteleri

Tablo 1. de serum AST ve ALT enzim aktiviteleri verilmiştir, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı (P<0.05) olarak AST ve ALT aktiviteleri yüksek bulundu.

CAPE+ parasetamol verilen gruplar, parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak (P<0.05) aktivitelerinin düştüğü gözlemlendi. Parasetamol +NAC verilen grup, parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında da bu grupta parasetamol grubuna göre AST ve ALT aktiviteleri anlamlı (P<0.05) bir düşüş gözlemlendi. Gözlenen düşüşün CAPE+Parasetamol grubundan daha fazla olduğu dikkat çekti. CAPE ve etanol gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 1. Serum AST ve ALT aktiviteleri.

Table 1. Serum AST and ALT activitys.

Grup	AST (U/L)	ALT (U/L)
Kontrol	88.42 \pm 6.07 ^a	26.32 \pm 7.02 ^{a,b}
Parasetamol	400.28 \pm 5.87 ^d	170.61 \pm 21.64 ^d
Parasetamol+CAPE	224.42 \pm 14.10 ^c	59.85 \pm 5.11 ^c
Parasetamol+NAC	144.42 \pm 14.17 ^b	35.58 \pm 4.59 ^{a,b}
CAPE	86.28 \pm 2.92 ^a	22.01 \pm 4.92 ^a
Etanol	93.01 \pm 11.47 ^a	27.17 \pm 8.89 ^a

(AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (P<0.05).

Doku SOD, CAT, GSH Seviyeleri

Karaciğer dokusundan elde edilen seviyeler tablo 2'de verilmiştir. Bulgularımıza göre, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antioksidan seviyeleri anlamlı olarak ($P<0.05$) düştüğü, CAPE+parasetamol

uygulamasının parasetamol grubuna göre ise anlamlı ($P<0.05$) olarak arttığını görüldü.

Parasetamol+NAC verilen grup parasetamol verilen grupla karşılaştırıldığında, antioksidan seviyeleri parasetamol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CAPE, etanol grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediler.

Tablo 2. Karaciğer dokusu SOD, CAT, GSH seviyeleri.**Table 2.** The levels of SOD, CAT and GSH liver tissue.

Grup	SOD (ng/ml)	CAT (ng/ml)	GSH (nmol/ml)
Kontrol	4.01±0.014 ^a	79.21±0.62 ^a	41.19±3.60 ^a
Parasetamol	2.01±0.007 ^b	58.44±0.54 ^b	1.427±1.42 ^e
Parasetamol+CAPE	4.02±0.016 ^a	78.26±0.52 ^a	40.69±2.56 ^d
Parasetamol+NAC	3.04±0.016 ^c	67.66±2.46 ^c	27.96±5.44 ^c
CAPE	4.05±0.011 ^d	79.09±0.77 ^a	36.37±4.43 ^{a,b}
Etanol	4.05±0.027 ^d	78.62±1.05 ^a	33.90±4.71 ^b

(SOD: Süperoksit Dismutaz, CAT: Katalaz, GSH: Glutatyon, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Doku TAS, TOS, MDA Seviyeleri

Karaciğer TAS, TOS, MDA seviyeleri, tablo3. de gösterilmiştir. Bulgularımıza göre, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığı, TOS ve MDA seviyeleri anlamlı ($P<0.05$) olarak yüksek TAS seviyeleri anlamlı olarak ($P<0.05$) düşük bulunmuştur.

CAPE+parasetamol verilen grup parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA ve TOS seviyelerinin düştüğü, TAS seviyesinin ise yükseldiği görülmüştür. Parasetamol+NAC verilen grup, parasetamol verilen grupla karşılaştırıldığında ise CAPE+parasetamol grubuna benzer sonuçlar alınmıştır. CAPE ve Etanol gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 3. Karaciğer dokusu TAS, TOS ve MDA seviyeleri.**Table 3.** The levels of TAS, TOS and MDA in liver tissue.

Grup	TAS (mmol Trolox Ekvivalent/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekvivalent/L)	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	6.19±0.39 ^a	3.66±0.47 ^a	0.15±.034 ^a
Parasetamol	1.35±0.07 ^b	10.67±0.17 ^e	0.74±.020 ^b
Parasetamol+CAPE	4.52±0.4 ^c	5.73±0.16 ^d	0.22±.020 ^c
Parasetamol+NAC	4.38±0.02 ^c	5.51±0.03 ^d	0.21±.011 ^c
CAPE	6.17±0.05 ^a	4.84±0.08 ^b	0.23±.033 ^c
Etanol	6.18±0.09 ^a	4.41±0.28 ^c	0.22±.036 ^c

(TAS: Total antioksidan durum, TOS: total oksidan durum, MDA: Malondialdehit, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Doku TNF- α , IL 1 β , IL-18 Seviyeleri

Bulgularımıza göre, TNF- α , IL-1 β , IL-18 seviyeleri parasetamol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek, parasetamol+CAPE verilen

grupta ise anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek olduğu görülmüştür.

CAPE+NAC verilen gruba parasetamol grubu karşılaştırıldığında, sitokin seviyelerinin anlamlı olarak ($P<0.05$) düştüğü görülmüştür.

CAPE ve etanol grupları ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Tablo 4. Karaciğer dokusu TNF- α , IL-1 β ve IL-18 seviyeleri.

Table 4. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-18 liver tissue.

Grup	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-18 (ng/L)
Kontrol	328.95 \pm 31.16 ^{a,e}	2.51 \pm 0.39 ^a	43.99 \pm 1.80 ^{a,e}
Parasetamol	430.63 \pm 16.17 ^b	2.39 \pm 0.34 ^a	71.78 \pm 3.55 ^b
Parasetamol+CAPE	313.47 \pm 64.27 ^c	2.02 \pm 0.24 ^b	33.80 \pm 3.481 ^c
Parasetamol+NAC	369.08 \pm 45.70 ^d	2.03 \pm 0.24 ^b	40.78 \pm 2.93 ^d
CAPE	335.88 \pm 33.22 ^e	2.13 \pm 0.14, ^c	44.63 \pm 1.82 ^e
Etanol	329.78 \pm 35.64 ^e	2.19 \pm 0.31 ^c	37.21 \pm 2.30 ^f

(TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör-alfa, IL-1 β : Interleukin 1 beta, IL-18: Interleukin-18, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)

a.b.c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Parasetamol (Asetaminofen), dünyada en çok tüketilen analjezik-antipiretik ajanlardan biri olup, terapötik dozlarda kullanıldığında güvenli, yüksek dozda kullanıldığında ise karaciğer nekrozu, böbrek toksisitesi ve hatta ölüme neden olduğu deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (1).

Aynı zamanda, parasetamol toksisitesinde gerçek bir tedavi bulunmamaktadır. Bu sebeple literatüre baktığımız zaman pek çok deneysel veya klinik alternatif tedavi yöntemlerinin denendiği görülmektedir. Parasetamol zehirlenmesinin standart tedavisi NAC'dir. NAC, amino asit L-sistein ve GSH'nın her ikisinin asetilenmiş bir prekürsörüdür ve yıllardır parasetamol aşırı alımlarına bağlı toksisitenin önlenmesi için bir antidot olarak kullanılmıştır. Günümüzde hayvan ve insan çalışmalarıyla NAC'ın güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiş ve serbest radikaller ve oksidan hasarla karakterize çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik ajan olarak kullanılmıştır (11).

Oksidatif stresin parasetamol toksisitesinde önemli rol oynadığı kabul edilip, parasetamolün reaktif ara ürünü olan N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) oksidasyonundaki artışı, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumlarında artışa sebep olmaktadır. NPAQI'nin karaciğerde hasar

oluşturabilmesi için parasetamolün yüksek dozlarda alınması gerekir. Bu reaktif ürünün GSH depolarını tamamen tüketmesinden dolayı karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir (12).

Yapılan çalışmada, literatürde yapılan araştırmalarla antioksidan sistemi ve temel metabolik parametreleri olumlu yönde desteklediği düşünülen, CAPE nin parasetamolün neden olduğu karaciğer hasarına olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kaynaklardaki veriler göz önüne alındığında parasetamolün 750 mg/kg, 1, 2 ve 3 g/kg dozlarının uygulamasında benzer hasarların meydana geldiği fakat şiddetlerinin farklı ölçülerde olduğu tespit edilmiştir. Önceki yapılan çalışmalarda fareler üzerinde yapılan birçok deneysel işlemlerde parasetamolün 300 mg/kg ve bunun üzerindeki dozlarda kullanılmasıyla birlikte akut karaciğer nekrozuna şiddetli olarak etkisini gösterdiği tespit edilmiştir (13,14).

Parasetamol ya da başka toksik madde ile oluşturulan karaciğer hasarı, karaciğer fonksiyonunu ölçmek için biyokimyasal (ALT) ve (AST) enzimlerinin oluşturduğu seviyeler, karaciğer dokusundaki en önemli belirteçlerdendir. ALT ve AST hepatosellüler hasar ya da nekroza bağlı olarak artmaktadır.

Vücudun antioksidan savunma sistemi ile serbest radikaller arasındaki dengenin oksidanlar

lehine kayması durumuna oksidatif stres denilmektedir (13). Oksidatif stres, hücre membranı ve diğer hücre bileşenlerinin değişimiyle sonuçlanan lipidlerin ve diğer makromoleküllerin oksidatif tahribatına yol açarak, hücrenin nekroz ve ölümüne dolayısıyla doku hasarına ve kronik hastalıklara sebep olmaktadır (13). Aynı zamanda birçok farklı hastalık için kullanılan ilaçların vücutta birikimi sonucunda da serbest radikal oluşmaktadır. Serbest radikallerin oluşumu, parasetamol toksisitesinde artarak doymamış yağ asitlerinin yıkılmasına yol açar ve hücrede hasara neden olur (13,14,15). Yapılan araştırmalarda parasetamol indüklü karaciğer hasarı sonucu, reaktif oksijen ürünlerinin düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, antioksidan enzimlerin düzeylerinin ise düşük bulunduğu belirtilmiştir (15).

Ratlarda parasetamol ile hepatotoksosite oluşturulan çalışmalarda, toksikasyon grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MDA düzeyinde artma söz konusu olmuştur (16,17). Parasetamolle toksik hepatit oluşturulmuş ratlarda plazma MDA düzeyi kontrol grubuna göre artış gösterirken karaciğer MDA düzeyi önemli oranda artış göstermiştir (17).

Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da parasetamol toksikasyonu sonucunda meydana gelen karaciğer hasarı sonucu CAT ve SOD düzeyleri incelenmiş, Domitrovich ve ark. (18)'na göre toksisite oluşturulan grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman serum SOD düzeyinde önemli derecede artış tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, toksikasyon sebebiyle serbest radikal artışına bağlı gelişen antioksidan savunma sistemindeki artışa bağlı olarak antioksidan enzim seviyelerinin arttığını düşündürmektedir. Bu çalışmada, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOD seviyeleri parasetamol grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur, elde edilen veriler bize oksidatif stres sonucu varlığında antioksidan seviyelerinin azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

Bir başka parasetamol uygulanan çalışmada, hepatotoksosite oluşturulan gruplarda kontrol

grubuyla karşılaştırıldığında CAT aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir (16). Bulgular, sunulan bu çalışmanın bulgularıyla uyumludur.

Parasetamol toksisitesine bağlı meydana gelen karaciğer hasarında, oksidatif stres oluşumu gözlenirken aynı zamanda serum sitokinlerinin ve özellikle TNF- α 'nın da önemli olduğu yapılan son çalışmalarda tespit edilmiştir. TNF- α genellikle karaciğerdeki makrofajlardan üretilen proinflamatuvar sitokin özelliğine sahiptir. Sistemik toksisitenin ve karaciğer hasarının primer mediatörüdür ve karaciğer hasarının birçok tipinde TNF- α 'nın önemi bilinmektedir (19).

Parasetamol indüklü hepatotoksosite modelinde kontrol grubunda oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı, CAPE verilen gruplar ile parasetamol grubu karşılaştırıldığında CAPE'nin meydana gelen inflamasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir. Karaciğer hasarında erken ortaya çıkan TNF-alfa diğer inflamatuvar sitokinlerin yapımını da tetiklemektedir.

İlaç ile oluşturulan hepatotoksitede üretilen TNF- α , IL- β gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin doku hasarının hızlanmasında etkili oldukları ispatlanmıştır (20,21).

TNF α hem hepatositler için mitojenik olup karaciğer hasarındaki onarımda ve kısmi hepatektomiye takiben rejenerasyonda görev alır hem de aşırı inflamatuvar cevabı indükleyerek hücre hasarına sebep olabilir (22).

Teng ve arkadaşlarının (23) yaptığı çalışmada *Tournefortia sarmentosa* adlı maddenin parasetamol toksisitesine bağlı gelişen hepatotoksosite üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada parasetamol toksisitesi oluşturulan gruptaki TNF- α düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı derecede artmıştır. *Tournefortia sarmentosa* ile tedavi edilen gruplarda ölçülen TNF- α düzeyleri toksisite grubuna kıyasla anlamlı düşük bulunmuş. Yan-Ling Wu ve arkadaşlarının (24) yaptığı çalışmada farelerde parasetamol ile toksisite

oluşturulmuş ve parasetamol verilen gruplarda TNF- α seviyesinin yükseldiği tespit edilirken acanthoic acid verilen grupta belirgin düşük olduğu tespit edilmiş. Sheng-Lei Yan ve arkadaşlarının (25) yaptığı çalışma bütün diğer çalışmaları destekler nitelikte olup karaciğer toksisitesi oluştuğunda TNF- α seviyesinin yükseldiği ve uygulanan tedavinin başarısına göre toksisite azaldıkça TNF- α seviyesinin azaldığı gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada, Yan-Ling Wu ve arkadaşları, fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada parasetamol ile toksisite oluşturulmuş ve TNF- α seviyesinin arttığını göstermişlerdir (26). Sunulan bu çalışmada parasetamol ile karaciğer toksisitesinde TNF- α 'nın önemli bir şekilde arttığını gözlemlendi ve literatürle uyumlu olduğu tespit edildi.

Çalışmanın sonunda, parasetamol verilen grupta, AST ve ALT enzimlerinin kontrol grubuna göre anlamlı artışı, parasetamolün karaciğer hepatotoksikasyonu oluşturması bakımından literatürle uyumludur. Aynı zamanda, parasetamol kaynaklı karaciğer hasarı sonrasında serbest radikallerin seviyelerinin arttığı, antioksidanların ve antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür, buna bağlı olarak oluşan oksidatif stres aracılığı ile parasetamolün karaciğerde hasar meydana getirdiği düşünülebilir, bununla birlikte inflamatuvar belirteçlerin düzeylerindeki artış, parasetamolün oluşturduğu inflamasyonu ortaya koymuştur. Oluşan hasara karşı ise CAPE'nin parasetamol kaynaklı hepatotoksisiteye neden olduğu düşünülen oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyucu bir rol oynayabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan çalışmanın en önemli verilerinden birisi CAPE'nin parasetamol kaynaklı oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu bir etki göstermesidir.

Elde edilen veriler ışığında, CAPE'nin karaciğer hasarına neden olan durumlarda hepatositlerdeki hasarın önlenmesi veya azaltılması açısından tedavide kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, CAPE'nin hem yetişkin hem de çocukluk döneminde sık rastlanılan ve toplum sağlığını tehdit eden ilaç veya kimyasal madde zehirlenmesi sonucu oluşan karaciğer toksisitesini ve buna bağlı olarak gelişen komplikasyonların önlenmesinde yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Emet M., 2016. Asetaminofen (Parasetamol) Zehirlenmesi. Türkiye Klin J Emerg Med Top, 2, 51-57.
2. Jack A., Hinson Dean W., Roberts Laura P., 2010. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. Handb Exp Pharmacol, 196, 369-405.
3. Mohammed A., Almansori Hassan I., Alhammadi Fahad A., 2015. Paracetamol overdose: Analysis of a sample from a tertiary hospital in Eastern Saudi Arabia. Saudi J Med Sci, 3, 209-212.
4. Licata A., 2016. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. Eur J Intern Med, 28, 9-16.
5. Hepşen F., Tdlgen F., Er H., 1996. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 3, 386-391.
6. Azza H., Sobhy E., Asmaa E., Ahmed A., 2016. Effect of bee venom or propolis on molecular and parasitological aspects of Schistosoma mansoni infected mice. J Parasit Dis, 40, 390-400.
7. Ümit G., Cihan T., İzzet S., Bugra C., Mustafa O., Tayfun G., Engin D., 2017. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. Int J Morphol, 35, 141-147.
8. Laura C., Marco B., Jianbo X., Bruno B., 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. Front

- Pharmacol, 8, 412-419.
9. Uzkeser M., Karakus E., Albayrak A., Kiki İ., Bayir Y., Cadirci E., Unal D., Halici Z., Karadeniz A., 2012. Protective effect of panax ginseng against N-acetyl-pamino-phenol-induced hepatotoxicity in rats. *Afr J Pharm*, 6, 2634-2642.
 10. Sushil JK., 1986. Membran lipid peroxidation in erythrocytes of the newborn. *Cli Chi Acta*, 161, 301-306.
 11. Mun Chiang C., James P., 2016. Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases – a new field in medicine development. *Mol Aspects Med*, 47, 54-75.
 12. Halliwell B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-1150.
 13. Douidar SM., Boor PJ., Ahmed AE., 1985. Potentiation of the hepatotoxic effect of acetaminophen by prior administration of salicylate. *J Pharmacol Exp Ther*, 233, 242-248.
 14. Mohammed M., Gulrana K., Mohammad F., Sohail H., Mohammad AS, 2016. Cadmium-induced nephrotoxicity via oxidative stress in male Wistar rats and capsaicin protects its toxicity. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 5, 05-11.
 15. Hoi-Shan W., Pratiksha A., Vojtech M., Pierre-Axel M., Martin D., 2017. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem*, 292, 16804-16809.
 16. Parmar SR., Vashrambhai PH., Kalia K., 2010. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *J Herb Med*, 4, 101-106.
 17. Naguib YM., Azmy RM., Samaka RM., Salem MF., 2014. *Pleurotus ostreatus* opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury. *BMC Complement Altern Med*, 14, 494.
 18. Domitrovic R., Jakovac H., Rahelic D., Romc Z., Tadic Z., 2010. Antifibrotic activity of taraxacum officinale root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*, 130, 569-577.
 19. Malhi H., Gores GJ., Lemasters JJ., 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 43, 31-44.
 20. Yuan Mohamed A., Richard D., Salminen L., Mendrick Y., 2017. Proteomic analysis of acetaminophen-induced hepatotoxicity and identification of heme oxygenase 1 as a potential plasma biomarker of liver injury. *Proteomics Clin Appl*, 11, 1600123.
 21. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK., Herunsalee A., Charuchongkolwongse S., Niumsakul S., Srichairat S., 2005. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull*, 28, 1165-1171.
 22. Luster MI., Simeonova PP., Gallucci RM., Bruccoleri A., Blazka ME., Yuceosoy B., Matheson JM., 2009. The role of tumor necrosis factor alpha in chemical-induced hepatotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 919, 214-20.
 23. Teng CY., Lai YL., Huang HI., Hsu WH., Yang CC., Kuo WH., 2012. *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharm Biol*, 50, 291-396.
 24. Wu YL., Jiang YZ., Jin XJ., Lian LH., Piao JY., Wan Y., Jin HR., Joon Lee J., Nan JX., 2010. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine*, 17, 475-479.
 25. Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. 2009. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of food science*, 74, 259-260.
 26. Wu YL., Jiang YZ., Jin XJ., Lian LH., Piao JY., Wan Y., Jin HR., Joon LJ., Nan JX., 2010. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine*, 17, 475-479.



Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*

Deniz YENİ^{1a}, Fatih AVDATEK^{1b}, Mustafa GÜNDOĞAN^{1c}

1. Afyonkocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0002-9105-5677^a, 0000-0003-2345-8826^b, 0000-0002-3292-4625^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
-----------------------	-----------------------	------------------------

19.07.2019

08.10.2019

25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/Tocitethisarticle:

Yeni D, Avdatek F, Gündoğan M: Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,14(3): 299-306, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.594130.

Öz: Bu çalışmanın amacı kısa süreli (5 °C)'de saklanan Merinos koç spermasında 0, 24, 48 ve 72. saatlerde sığır serum albumininin (BSA) sperma kalitesi ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemektir. Ejekülatlar beş baş Merinos ırkı koçtan suni vajen ile toplandı ve değerlendirmeler 37 °C'de yapıldı. Tüm çalışma altı kez tekrar edildi. Toplanan koç sperması örnekleri dörde bölündü ve Tris temelli sulandırıcı ile sulandırılan spermaya (0, 2, 4 ve 6 mg/ml) dozlarında BSA eklendi ve motilite, anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü ve canlılık, akrozom bütünlüğü ve DNA hasarı (COMET testi) belirlendi. Çalışma gruplarından 4 mg/ml BSA içeren grup, 72 saatlik depolamaya kadar, kontrol ile karşılaştırıldığında daha yüksek motilite yüzdeleri, plazma membran bütünlüğü ve canlılık gösterdi (P<0.05). Araştırmamızın 24 ve 48. saatlerinde DNA hasarı BSA'nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Bununla beraber anormal spermatozoon oranları yönünden BSA'nın tüm dozlarında 24, 48 ve 72 saatler sonunda kontrol grubuna göre daha düşük değerler olduğu görüldü (P<0.05). Sonuç olarak, kısa süreli saklamada koç sperma parametreleri için özellikle 4 mg/ml BSA eklemenin yararlı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: BSA, DNA hasarı, Kısa süreli saklama, Koç sperması.

The Effect of Different Concentrations of Bovine Serum Albumin on Sperm Quality and DNA Damage in Short Term Stored Ram Semen

Abstract: In the present research the aim was emphasized to find out the effects of bovine serum albumin (BSA) on quality of sperm and DNA damage at 0, 24 th, 48 th and 72 th hours in Merino ram semen at short term preservation (5°C). Ejaculates were obtained from five Merino Rams which were collected by artificial vagina and all the samples were pooled at 37°C for detection. All the procedures were applied six times concurrently. Different concentrations (0, 2, 4 and 6 mg/ml) of BSA with Tris-based extender was used for dilution on semen samples. Sperm motility, abnormality, plasma membrane integrity, acrosome integrity and % DNA in tail (COMET assay) content were measured and analyzed. The extender with 4 mg/ml of BSA had both higher motility percentages and plasma membrane integrity, when compare with the control, up to 72 hours (P<0.05). At the 24th and 48th hours of the study, DNA damage was lower in all doses of BSA than in the control group. In addition, in terms of abnormal spermatozoon rates, all doses of BSA were lower than the control group at 24, 48 and 72 hours (P<0.05). In conclusion, it was found to be especially useful to add 4 mg / ml BSA for the ram semen parameters in short term storage.

Keywords: BSA, DNA integrity, Liquid storage, Ram semen.

✉DenizYeni

Afyonkocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
e-posta: dyeni@aku.edu.tr

*Bu çalışma 17.KARIYER. 68 numaralı proje ile AKÜ BAPK tarafından desteklenmiş ve II. International Congress on Advances in VeterinarySciences&Technics (ICAVST, 2017, Skopje, Macedonia) kongresinde sunulmuştur.

GİRİŞ

Küçük ruminantlarda infertilite veya sterilite dışı hayvanlarda bireysel olarak çok fazla önem taşımazken erkek damızlıklarda sürünün fertilitesi açısından oldukça önemlidir. Küçük ruminantların mevsimsel poliöstrik hayvanlar olmaları ve aşım sezonu esnasında tohumlandıkları halde gebe kalmayan dişilerin genellikle kasaplık olarak değerlendirilmeleri, dölveriminin azalmasına neden olmaktadır.

Spermanın soğutulması veya dondurularak saklama metodlarının amacı, spermatozoanın metabolizmasını yavaşlatmak ve enerjisini azaltarak fertil yaşam süresini uzatmaktır. Bu durum araştırmacıları spermayı saklama yöntemi olarak iki yöntem geliştirmeye sevk etmiştir. Bunlardan ilki likit durumda olan spermanın sıcaklığının istenilen derecelere kadar düşürülmesi (0-5°C veya 10-15°C) ve bu derecelerde spermatozoanın dönüşümlü olarak inaktif duruma getirilmesi, bir diğeri ise, 0°C'den daha düşük sıcaklıklarda dondurularak yapılan saklama yöntemidir. Kısa süreli saklama için en uygun olan sıcaklık dereceleri ile ilgili olarak şimdiye kadar çeşitli görüşler ortaya atılmıştır. Kimi araştırmacılar kısa süreli saklama açısından en ideal sıcaklıkların 10-15°C olduğunu, bazıları da boğa ve koç spermalarının fertilizasyon kabiliyetlerinin devamı açısından 0-5°C'lerin daha uygun olduğunu iddia etmişlerdir (1-3).

Geniş antioksidan türleri arasında BSA, spermatozoonlara karşı çok fonksiyonlu etkisi nedeniyle dikkat çekmektedir. Antioksidan kapasitesine ek olarak, BSA'nın motiliteyi hızlandırdığı, membran ve DNA bütünlüğünü koruduğu, spermatozoa'nın canlılığını arttırdığı ve kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu indüklediği bildirilmiştir. Bunların bir sonucu olarak, BSA eklenmiş sulandırıcılar, çeşitli memeli sperma türlerinin dondurulması ve kısa süreli saklanmasında kullanılmaktadır (4-7). Sığır serum albumini (BSA) geniş bir protein molekülüdür ve reproduktif sistem sekresyonlarında bulunur. Koç spermasında

çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini artırmaktadır. Kolesterol ve BSA en iyi membran koruyucular olarak spermanın kryopreservasyonunda sperma sulandırıcılarına yoğun olarak katılmaktadır (8).

Spermatozoonlardaki genetik hasar ile infertilite arasında önemli bir ilişki vardır. Spermatozoon DNA hasarının infertilite açısından önemi in vitro ve in vivo olarak pek çok kez ortaya konmuştur. Sonuç olarak da DNA hasarlı spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetini azaldığı ve artan DNA hasarlı spermatozoon oranının doğal yolla gebe kalma oranını da azaltabileceği bildirilmektedir (9).

Bu çalışmanın amacı kısa süreli (5 °C)'de saklanan Merinos koç spermasında 0, 24, 48 ve 72. saatlerde BSA'nın farklı dozlarının bazı spermatolojik özellikler ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmamızda hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği şartlarında bakım ve beslenmesi yapılan 3-5 yaşlarında 5 baş Merinos ırkı koç kullanıldı. Çalışma boyunca koçlara yapılan bütün müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından araştırmacılara bildirilen kurallar çerçevesinde 03.05.2017 tarihli, (AKÜHADYEK 202-17) referans no'lu ve 73 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Üreme mevsimi dışında, her bir koçtan haftada iki kez olmak üzere toplam 6 ejakulat toplandı. Sperma sulandırıcı olarak Tris (Trisma base 3.63 g, sitrik asit 1.99 g, fruktoz 0.50 g) kullanıldı. Daha sonra farklı yoğunluklarda BSA (2, 4 ve 6 mg/ml) ve herhangi bir antioksidan içermeyen (kontrol) grubu ile birlikte 4 farklı içerikte grup oluşturuldu. Koçlardan elde edilen sperma örnekleri birleştirilerek (pooling) spermatolojik muayeneleri yapıldı ve 4 eşit hacme bölündü. Sulandırılmış olan gruplar 2-2.5 saatte 5°C'ye soğutulduktan sonra

çalışma süresince aynı sıcaklıkta muhafaza edildi. Soğutulma sonrası 0., 24., 48. ve 72. saatlerde spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı sonuçları belirlendi. Çalışma süresince sperma örnekleri +5 C° sıcaklıkta saklandı ve yapılan işlemler 6 kez tekrarlandı.

Spermatojolojik Muayeneler

Sperma motilitesi 37°C'de ısıtma tablası kullanılan faz kontrast ataçmanlı mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 20x objektifte ve en az 3 farklı alanın ortalaması alınarak yüzde değer olarak kaydedildi (10). Anormal spermatozoon oranları Giemsa boyama yöntemiyle ve mikroskopta immersiyon objektif (100x) kullanmak suretiyle belirlenerek bozukluklar % olarak kaydedildi (11). Membran bütünlüğü ve canlılığının birlikte değerlendirildiği bir test olan HE testi Gündoğan ve ark. (12)'nin metodu kullanılarak yapıldı. Örnekler, 100 mOsm/l'te ayarlanmış HOS (sodyum sitrat-fruktoz) test solüsyonu içerisine %1'lik eozin-Y ilave edilerek ve 35°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası frotiler hızlıca kurutularak hazır hale getirildi. Hazırlanan preparatlarda toplam 200 hücre sayıldı ve spermatozoon baş kısmının boya alma ve kuyruğunun kıvrılma durumlarına göre;

I.Tip: Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış, HOS+/E-

II.Tip : Kuyruğu şişmemiş ve başı boya almamış, HOS-/E-

III.Tip: Kuyruğu şişmiş ve başı boya almış, HOS+/E+

IV.Tip: Kuyruğu şişmemiş ve başı boya almış, HOS-/E+ şeklinde değerlendirildi.

Spermatozoon DNA hasarı COMET Assay (13) metoduna göre yapıldı floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus CX-31) ile her slayttan 100 adet DNA görüntüsü Comet Skor 1.5 (TriTekCorporation) görüntü analiz sistemi ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik normallik varsayımları açısından ShapiroWilks testi ile varyansların homojenliği ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel olarak kontrolü tek varyans analizi (One-Way ANOVA) ile belirlendi. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar ise ortalama ± standart hata olarak verildi. Bütün istatistiksel analizler en az %5 hata payı ile incelendi. SPSS (Windows; SPSS, 13.0, Chicago, IL, USA) paket programından yararlanıldı ve P<0.05 düzeyi önemli kabul edildi.

BULGULAR

Kısa süreli saklama işlemi boyunca farklı dozlarda BSA'nın sperma özellikleri üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda Tablo 1, 0. saat (sulandırıcı sıcaklığı 5°C'ye ulaştığında), Tablo 2, 24. saat, Tablo 3, 48. saat ve Tablo 4, 72. saatler de çalışma gruplarının motilite, anormal spermatozoon ve akrozom oranı, plazma membrane fonksiyonel bütünlüğü ve canlılığı ile DNA hasarını göstermektedir.

Tablo 1. Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları (± SEM, n:30).

Table 1. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 0 h in the study (± SEM, n:30).

Gruplar (n=30)	Motilite (%)	0 h			
		Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	82.0±2.00 ^b	9.1±0.30 ^a	9.7±0.40 ^b	58.4±0.51 ^b	3.6±0.36 ^{bc}
2 mg/ml BSA	83.0±1.70 ^b	5.2±0.70 ^b	12.0±0.63 ^a	57.0±0.83 ^b	3.3±0.12 ^b
4 mg/ml BSA	90.0±0.02 ^b	5.4±0.27 ^b	8.2±0.37 ^c	67.0±0.70 ^a	3.5±0.44 ^b
6 mg/ml BSA	82.0±2.00 ^b	5.7±0.63 ^b	6.4±0.51 ^d	58.0±0.89 ^b	4.2±0.10 ^a

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Sığır Serum Albumini.

Tablo 2. Çalışmada 24. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 2. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 24 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

24 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	78.0±2.00 ^{bc}	10.9±0.70 ^a	11.0±0.71 ^c	60.0±0.54	10.4±0.63 ^a
2 mg/ml BSA	80.0±3.16 ^b	6.6±0.17 ^b	14.6±1.31 ^b	56.4±0.88	8.50±0.48 ^b
4 mg/ml BSA	88.0±2.00 ^a	5.5±0.55 ^b	15.8±0.20 ^b	64.0±1.41	5.40±0.36 ^c
6 mg/ml BSA	80.0±3.13 ^b	5.6±0.43 ^b	20.1±2.94 ^a	60.5±3.22	8.60±0.65 ^b

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Tablo 3. Çalışmada 48. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 3. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 48 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

48 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	70.0±4.47 ^b	12.1±0.87 ^a	19.5±0.13 ^a	50.2±0.66 ^b	17.1±1.41 ^a
2 mg/ml BSA	78.0±2.16 ^a	7.2±0.56 ^b	14.0±0.11 ^b	56.0±0.31 ^a	10.6±0.87 ^b
4 mg/ml BSA	86.6±1.66 ^a	6.6±0.85 ^b	19.1±0.75 ^a	56.4±0.50 ^a	6.9±0.87 ^c
6 mg/ml BSA	82.0±2.00 ^a	6.4±1.00 ^b	20.3±0.44 ^a	52.2±0.63 ^b	12.6±0.93 ^b

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (P < 0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Tablo 4. Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 4. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 72 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

72 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	58.0±2.00 ^c	14.1±0.55 ^a	20.2±0.53 ^b	35.2±1.95 ^c	22.2±1.41
2mg/ml BSA	56.0±1.85 ^c	8.5±0.41 ^b	18.8±0.48 ^b	52.1±0.35 ^b	19.6±3.71
4mg/ml BSA	76.0±2.00 ^a	6.9±0.88 ^c	19.5±0.40 ^b	60.8±1.15 ^a	16.2±3.28
6 mg/ml BSA	65.0±2.11 ^b	9.5±1.26 ^b	22.4±1.75 ^a	47.2±0.37 ^b	26.4±3.74

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (P < 0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Motilite değerleri kısa süreli saklama boyunca sürekli bir azalma gösterdi, 4 mg/ml BSA grubunun motilite değerleri 0. saat da dahil olmak üzere, çalışma boyunca kontrol grubuna göre yüksekti

(P<0.05). 72 saatlik saklama sonunda, 4 mg/ml grubu diğer gruplara göre daha yüksek motilite oranına sahipti (P<0.05).

BSA'nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre anormal spermatozoon oranları önemli düzeyde düşük bulundu ($P<0.05$). Anormal spermatozoon oranı 72. saat sonunda 4 mg/ml BSA içeren grupta en düşük düzeyde gözlemlendi ve bu değer tüm gruplara göre istatistik olarak önemli bulundu ($P<0.05$). Anormal akrozom oranı ise 6 mg/ml BSA grubunda 72. saatte kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($P<0.05$).

Membran fonksiyonel bütünlüğü ve canlılık açısından 24. saat dışındaki tüm analizlerde kontrol grubuna göre daha yüksek değerler elde edildi ($P<0.05$). Yetmiş iki saatlik saklama sonunda 4 mg/ml BSA grubunda H+E- değeri diğer gruplara göre daha yüksekti ve sonuçlar istatistik olarak önemli ($P<0.05$) bulundu.

Comet analiz sonuçlarına göre ise % tail DNA değerleri 24 ve 48. saatlerde 4 mg/ml BSA grubundaki DNA hasarı kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($P<0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kısa süreli saklama, kriyoprezervasyonun spermaya verdiği zararlı etkiler nedeniyle koç spermalarının saklanmasında bir alternatifi olarak kullanılmaktadır (14). Ancak spermayı kısa süreli saklamanın da olumsuz etkileri vardır. Kısa süreli saklamada devam eden spermatozoon metabolizması ve soğuk şoku, spermatozoon membranı üzerinde oksidatif stres oluşturur. Oksidatif stres membran akışkanlığını ve enzimatik aktiviteyi değiştirdiğinden spermatozoon yapısına geri dönüşümsüz biçimde zarar verir. Bu değişiklikler, spermatozoonun hareketliliğini, canlılığını ve fertilizasyon kabiliyetini düşürür ve MDA düzeylerini de artırır (15). BSA, kararlılığı iyi amino asit profili ve koruyucu fonksiyonundan dolayı, araştırmacılar tarafından pek çok kez sperma sulandırıcısına ilave edilmiştir (7,17,18).

Spermatozoonların motilitesi, sperma değerlendirmesi için vazgeçilmez faktördür. Serviks yoluyla geçiş kabiliyeti ve zona pellucida'nın penetrasyonu için bir göstergedir (16). Birçok

araştırmacı, BSA'nın bilinmeyen bir mekanizma ile spermatozoon motilitesini uyardığını bildirmişlerdir (7,17,18). Çalışmamızda gruplar arasında 0., 24., 48. ve 72. saatlerde motiliteyi kontrol grubuna göre önemli derecede artırdı. 48. saatte tüm BSA gruplarında motilite kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksekti. 2 mg/ml BSA grubu, 72. saatte sperma motilitesini 4 mg/ml BSA grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttı; ancak aynı zaman noktasındaki kontrol ve 2 mg/ml BSA motilite değerleri arasında fark yoktu. Sonuçlarımız daha önce yapılan bazı araştırma sonuçlarıyla paralellik arz etmemektedir (17,19). Bu durumun farklı hayvan türlerinin kullanılması ve saklama yönteminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız da 72 saat sonunda, 4 mg/ml BSA grubunun motilite değeri diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti ve bu motilite düzeyi (%76) suni tohumlama için kabul edilebilirliği yüksek bir değerdir. Kısa süreli saklanan koç spermalarının motilite değerleri, daha önceki çalışmalarda %50-56, %70-84, %60-80, %40-78, %30-77 (sırasıyla 0, 24, 48 ve 72 saat) arasında değişmektedir (20,21,22,23). Çalışmamız sezon dışında yapılmasına rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar bu değerlerle uyum içindedir.

Spermatozoonların membran hasarı, soğuk şoku, lipid peroksidasyon ve spermatozoa yaşlanmasından kaynaklanır. Soğuk şoku muhtemelen membran lipidlerinin faz geçişine bağlı spermatozoonun faz ayrımı ve seçici geçirgenliğinin kaybı ile ilgilidir (14). BSA, spermatozoon membranına yapışır ve spermatozoonun lipid kompozisyonunu, plazma membranının lipid değişimi veya hidrolizi, protein hidrolizi ve plazma membranının kolesterol ve fosfolipid yoğunluğunun azalması gibi çeşitli şekillerde değiştirir (24). Plazma membranında artan akışkanlığın spermatozoonun soğuk şokuna karşı duyarlılığını azalttığı bilinmektedir (19). Dolayısıyla BSA'nın soğuk şoka karşı koruyucu etkisi membran akışkanlığını arttırmaya bağlıdır. Spermatozoon parametrelerinin arasında, plazma membranının fonksiyonel bütünlüğü, sperma kalitesinin değerlendirilmesi için çok önemlidir,

çünkü spermatozoonun hayatta kalması için gerekli sınır çizgisini gösterir (16). Plazma zarları spermatozoon sinyalizasyonunu sürdürür ve çevreleyen ortam ile etkileşim sağlarlar, böylece spermatozoon metabolizmasında temel roller oynarlar (4). Plazma zarları ayrıca kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve son olarak spermatozoon oosit füzyonunda da önemli rol oynamaktadır (16). HOS testin, spermatozoon membranlarının fonksiyonel bütünlüğünde meydana gelen küçük değişiklikleri bile tespit etmede etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir (22). Akrozom bütünlüğü fertilizasyon sürecindeki diğer bir önemli faktördür çünkü spermatozoon penetrasyonu ve zona pellusidaya füzyon ile ilişkilendirilmiştir (25). Sarıözkan ve ark. (15), BSA'nın akrozomal bütünlüğü koruduğunu bildirmişler, sonuçlarımız bu fikri doğrulamıştır. Beklendiği gibi plazma zarı ve akrozom bütünlüğü spermatozoanın kısa süreli saklanması sürecinde düzenli olarak azaldı. Bununla birlikte, BSA'nın (2 mg/ml) plazma membranının fonksiyonel bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkisini gözlemledik. Çalışmamızdaki 2 mg/ml BSA grubunun HOST/E ve akrozom bütünlüğü değerlerini daha önce yapılan çalışmalarla uyum içinde olduğunu belirledik (22).

Düşük sıcaklıklar spermatozoonun membran lipitlerinde faz değişiklikleri ve ozmotik basınç değişimi nedeniyle soğuk şokuna ve membran değişikliklerine sebep olur (23). Fertilité potansiyelinin korunmasında spermatozoon DNA bütünlüğü çok önemlidir. Çeşitli mekanizmalar spermatozoon DNA'sına zarar verebilir. Spermatozoonlar soğuk şoku kaynaklı hasarlara özellikle duyarlı oldukları için, plazma membranları büyük miktarlarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden sitoplazma düşük yoğunluklarda temizleyici enzimler içerir (7,18).

Çalışmamızda özellikle 24. ve 48. saatlerde 4 mg/ml BSA grubunda en düşük DNA hasarı elde edilmiş bu değerler istatistiki olarak önemli bulunmuş ve 72. saatte de nispi olarak en düşük DNA hasarı düzeyi elde edilmiştir. Oksidan üretimi ve antioksidan

koruma dengesinin sağlıklı biyolojik sistemlerin korunması için kritik olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, yüksek dozdaki antioksidanlar, pro-oksidanlar gibi davranmalarına rağmen en iyi hücre işlevleri için gerekli olan fizyolojik konsantrasyonlarda mevcut olan ROS ile etkileşme potansiyellerini takiben, hücre işlev bozukluğuna yol açarak redoks dengesini de bozabilirler. Yüksek ROS oranları, lipid peroksidasyonunun yanı sıra proteinler ve DNA gibi diğer hassas biyomoleküllerin oksidasyonuna yol açan zehirli bileşiklerdir (26,27,28).

Sonuç olarak bu çalışma, sezon dışında alınan ve kısa süreli saklama esnasında farklı dozlarda BSA eklenen koç spermasında, tris temelli sulandırıcı içine eklenen 4 mg / mL BSA kullanmanın açık bir avantaj oluşturduğunu gösterdi.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Salamon S., Maxwell WMC., 2000. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci, 62, 77-111.
2. Johnson LA., Weitze KF., Fiser P., Maxwell WMC., 2000. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci, 62, 143-172.
3. Huo LJ., Yue KZ., Yang ZM., 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. Reprod Fert Develop, 14, 509-514.
4. Akhter S., Rakha BA., Iqbal R., Ansari MS., 2014. Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. Pakistan J Zool, 46, 115-120.
5. Fu J., Li Y., Wang L., Zhen L., Yang Q., Li P., Li X., 2017. Bovine serum albumin and skim-milk improve boar sperm motility by enhancing energy metabolism and protein modifications

- during liquid storage at 17 °C. *Theriogenology*, 102, 87-97.
6. Sarıözkan S., Türk G., Cantürk F., Yay A., Eken A., Akçay A., 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, 67, 1-6.
 7. Uysal O., Bucak MN., 2007. Effect of oxidized serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet Brno*, 76, 383-390.
 8. Fardin A., Abbas F., Abbas K., 2010. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 61, 94-99.
 9. Hughes CM., Lewis SEM., Mckelvey-Martin VJ., Thompson W., 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 374, 261-268.
 10. Yeni D., Avdatek F., 2017. Kısa süreli saklanan epididimal Anadolu Mandası spermasına ilave edilen karnosik asitin etkisi. *Kocatepe Vet J*, 10, 187-195.
 11. Tamuli MK., Watson PF., 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci*, 35, 247-254.
 12. Avdatek F., Yeni D., Gündoğan M., 2018. Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet J*, 11, 126-133.
 13. Yeni D., İnanç ME., Avdatek F., Tuncer PB., Çil B., Türkmen R., Taşdemir U., 2018. Supplementation of rosmarinic acid has reduced oxidative stress on bull spermatozoa following the freeze thawing process. *CryoLetters*, 39, 156-165.
 14. Maxwell WMC., Salamon S., 1993. Liquid storage of ram semen. *Reprod Fertil Dev*, 5, 613-638.
 15. Sarıözkan S., Tuncer PB., Bucak MN., Ulutaş PA., 2009. Influence of various antioxidants on microscopic oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Vet Brno*, 78, 463-469.
 16. Alçay S., Gökçe E., Toker MB., Onder NT., Ustuner B., Uzabacı E., Gul Z., Cavus S., 2016. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 72, 269-273.
 17. Alçay S., Toker MB., Gökçe E., Önder NT., Üstüner B., Nur Z., 2019. Long term incubation resilience of post-thaw ram semen diluted with lecithin based extender supplemented with bovine serum albumin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25, 291-297.
 18. Uysal O., Bucak MN., Yavaş İ., Varışlı Ö., 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv*, 6, 1362-1366.
 19. El-Kon I., 2011. Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, 11, 495-502.
 20. Gökçe E., Alçay S., Gül Z., 2017. Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5 °C. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 313-320.
 21. Çoyan K., Başpınar N., Bucak MN., Akalın PP., Ataman MB., Ömür AD., Güngör S., Küçükğünay S., Özkalp B., Sarıözkan S., 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci*, 89, 426-431.
 22. Gündoğan M., Yeni D., Avdatek F., Fidan AF., 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, 122, 200-207.
 23. Sarıözkan S., Türk G., Cantürk F., Yay A., Eken A., Akçay A., 2013. The effect of bovine serum

- albümin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, 67, 1-6.
24. Davis BK., Byrne R., Hun B., 1979. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albümin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 558, 257-266.
25. Alçay S., Toker MB., Gökçe E., Üstüner B., Tekin Önder N., Sağırkaya H., Nur Z., Soylu M., 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71, 329-333.
26. Bouayed J., Bohn T., 2010. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 3, 228-237.
27. İnanç ME., Çil B., Yeni D., Avdatek F., Orakçı D., Tuncer PB., Türkmen R., Taşdemir U., 2019. The effect of green tea extract supplementation in bull bemen cryopreservation. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25, 703-708.
28. Avdatek F., Yeni D., İnanç ME., Çil B., Tuncer PB., Türkmen R., Taşdemir U., 2018. Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. *Andrologia*, 50, 1-7.



Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profilinin Belirlenmesi*

Yasemin KAPLAN^{1a}, Nihat ÖZYURLU^{2b}, Mehmet KÖSE^{2c✉}, Mehmet Osman ATLI^{2d},
İbrahim KÜÇÜKASLAN^{2e}, Mesut KIRBAŞ^{3f}

1. GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü ve Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, TÜRKİYE.
 2. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.
 3. Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya, TÜRKİYE.
- ORCID: 0000-0002-3071-4130^a, 0000-0001-8115-2222^b, 0000-0003-0070-8458^c, 0000-0001-9853-5334^d, 0000-0002-3458-4409^e, 0000-0003-3487-0541^f

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.07.2019	19.11.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kaplan Y, Özyurtlu N, Köse M, Atli MO, Küçükaslan İ, Kırbaş M: Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profilinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 307-314, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.588666.

Öz: Bu çalışmada, sığır ELISA-PAG (gebelik ilişkili glikoprotein) kitinin Konya Merinosu koyunlarda; 1) gebeliğin teşhisi ve 2) PAG'lerin erken gebelik plazma profilinin belirlenmesindeki kullanılabilirliği değerlendirildi. Bu amaçlar için, kan örnekleri gebeliğin 21-70. günleri arasında haftalık olarak alındı. Kit üreticisinin talimatına göre, PAG'lerin plazma seviyeleri belirlendi ve değer 0.3 OD'nin (optimal yoğunluk) üzerinde ise gebelik tanısı pozitif olarak kabul edildi. Gebeliğin 21 ve 70. günleri arasında PAG'lerin profilinde lineer benzeri bir artış olduğu belirlendi. PAG'lerin pozitif değer oranları 28, 35 ve 42. günlerde sırasıyla %30.8, %69.2 ve %66.7 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre, ticari sığır ELISA-PAG kitinin Konya Merinosu koyunlarda erken gebeliğin tespitinde ve fetoplasental yapının sağlığının izlenmesinde güvenilir olduğu belirlendi. Ancak, plazma örneklerinde gebelik tanısı için pozitif değer 0.3 OD kabul edilirse erken gebelikte yüksek bir hata payı ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Erken gebelik, Konya merinosu, Koyun, PAGs.

Detection of Plasma Profile of Pregnancy Associated Glycoproteins During Early Pregnancy in Pregnant *Konya Merino* Sheep

Abstract: In this study, the usability of bovine ELISA-PAGs (Pregnancy Associated Glycoproteins) kit was evaluated for 1) the diagnosis of pregnancy and 2) the determination of early pregnancy plasma profile of PAGs in Konya Merino ewes. For these purposes, the blood samples were taken from 21 to 70 days of pregnancy by weekly. According to the manufacturer's instruction, the plasma level of PAGs was determined and accepted as the positive for pregnancy, if it was above than 0.3 OD (optimal density). An approximately linear increase in plasma profile of PAGs was determined for the period from 21 to 70 days of pregnancy. Percentages of the positive value of PAGs for on days 28, 35 and 42 were recorded as 30.8%, 69.2%, and 66.7%, respectively. According to these results, it can be concluded that the commercial bovine ELISA-PAGs kit is good for detecting early pregnancy and monitoring fetoplasental unit well-being in Konya Merino ewes. However, there is still a high margin of error for ewes if considering 0.3 OD for the positive.

Keywords: Early pregnancy, Konya merino, PAGs, Sheep.

✉ Mehmet Köse

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.

e-posta: mehmetkose1977@gmail.com

*Bu çalışma, Yasemin Kaplan'ın Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsündeki "Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisinde Sığır Gebelik İlişkili Glikoprotein Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Plasental memelilerde fertilizasyonla şekillenen yeni canlı gebelik sürecinin uzunca bir bölümünde, uterusda plasenta adı verilen ekstra-embriyonik zarların oluşturduğu geçici doku içerisinde tutulur ve dış ortamda yaşayabileceği yetileri kazanır (1). Progresif nitelikteki bu süreçte plasenta, endometriyum ile embriyo/fötüs arasında zamanlaması ve kronolojisi türler arasında değişebilen hücresel ve moleküler düzeyde gerçekleşen kompleks etkileşimlerle oluşur. Bu kompleks yapılaşma plasentaya, türler arasında değişken olmakla birlikte, gebeliğin oluşumu ve devamlılığı için gerekli olan birçok hormon, büyüme faktörü, protein, enzim vb. molekülü sentezleme ve salgılama özelliği kazandırır (2-4).

Ruminantlarda gebeliğin erken dönemlerinden itibaren maternal kan dolaşımında belirlenebilen plasental kaynaklı proteinlerin başında; gebelik ilişkili glikoproteinler (PAGs) gelmektedir. Bu proteinler plasentanın mononükleer ve binükleer trofoblastik hücrelerince sentezlenir ve maternal kan dolaşımında binükleer hücrelerin endometriyuma göçü ve sinsityal plakların oluşturulma zamanlamasıyla uyumlu olarak belirlenebilir (5,6).

Gebelik spesifik protein B olarak da bilinen gebelik ilişkili glikoprotein ailesi aspartik proteinaz familyasına dahil olmakla birlikte, bazı PAG moleküllerinin enzimatik aktivitelerinin olmadığı da iyi bilinmektedir (7). PAG'ler, ruminantlarda değişken derecelerde glikosilasyona sahip, 10'dan fazla yakın ilişkili antijenik protein içeren multijenik bir gen ailesidir. İlk olarak ineklerin periferik kan dolaşımında bazı PAG'lerin moleküllerinin belirlenmesi sonrası koyunlarda yapılan çalışmalarda da sığır PAG'leri ile immünolojik etkileşimi olan PAG moleküllerinin bulunması; bu türde yapılan çalışmaları daha da arttırmış ve koyunlarda farklı PAG'leri kodlayan bir düzineden fazla cDNA tespit edilmiştir (8). PAG'ler, plasental kaynaklı olduğundan ve maternal kan dolaşımında belirlenebildiğinden, ruminantlarda plasental gelişiminin izlenmesi ve erken gebelik tanısı

amacıyla kullanılacak bir belirteç olarak kabul edilmektedir (7). Bununla birlikte bu moleküllerin gebeliğin çok erken döneminden itibaren üretilmeye başlamaları sebebiyle; özellikle erken gebelik fizyolojisinin anlaşılması amacıyla immünolojik bariyer, maternal immun sistemin regülasyonu, embriyonun implantasyonu ve blastogenesisteki fonksiyonları da araştırılmaya devam etmektedir (9).

Periferik kan dolaşımındaki PAG profillerinin koyun ırkları arasında değişken olduğu, bu nedenle her ırka özgü PAG'lerin profilinin belirlenmesinin gebelik tanısı için geçerli bir ölçüm değerinin tespiti açısından önemli olduğu belirtilmektedir (10). Konya Merinosu, diğer adıyla Orta Anadolu Merinosu; ana hattı Akkaraman, baba hattı Alman Et Merinosu olmak üzere geliştirilmiş ve ırk tescil komisyonu tarafından 28.12.2017 tarih ve 26740 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan 2007/52 nolu tebliğ ile tescil edilmiş, beyaz vücutlu, ince kuyruklu ve kuzu verimi 1.4 olan bir koyun ırkıdır (11). G2 ve G3 düzeyindeki Alman Et Merinosu x Akkaraman melezi koyun ve koçların kendi aralarında çiftleştirilmesi ve seleksiyonuyla geliştirilen Konya Merinosu %20 oranında Akkaraman kanı taşımaktadır (12). Bu ırk, Orta Anadolu'nun şartlarına çok iyi uyum sağlamıştır. Yetersiz mera şartlarından çok iyi yararlanabilmektedir ve yüksek yaşama gücü özelliklerine sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle yetiştiriciler tarafından çokça tercih edilen bir ırktır (13). Yerli ırklarımızın büyüme, yaşama gücü, besi performansı, döl verimi vb. özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte yerli ırklarda PAG'ler ve benzeri moleküllerin profillerinin belirlenmesi ileri fizyolojik araştırmalar ve pratik uygulamalar için temel öneme sahiptir (14).

Bu çalışmada, Konya Merinosu koyunlarda gebeliğin 21. gününden itibaren 70. gününe kadar haftalık örneklemelerle sığır ELISA-PAG kiti (IDEXX Bovine Pregnancy test kit, Switzerland AG, Stationsstrasse 12, 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland) kullanılarak gebelik ilişkili glikoproteinlerin ekspresyon

profilinin belirlenmesi ve erken gebelik tanısında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Çalışma; Dicle Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 29.11.2017 tarih ve 107860 sayılı kararları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Koyunların Seçilmesi ve İdaresi

Çalışma; Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Küçükbaş Hayvan Yetiştirme Bölümü'nde yetiştirilen *Konya Merinosu* koyunlarda yapıldı. Plazma örnekleri klinik olarak sağlıklı, en az bir doğum yapmış, iyi vücut kondisyonlu (1-5 skalasına göre 2.5-4 skoru olanlar), 2-5 yaş arasındaki koyunlar arasından seçilen 13 baş gebe koyundan elde edildi. Koyunlar gündüzleri yapay merada otlatılırken, geceleri yarı açık kapalı ağıllarda tutuldu. Koyunlara mera otlatmasına ilave olarak günde 300 gr/baş karma yem verildi.

Koyunlarda Östrüs Tespiti ve Çiftleştirilmesi

Koyunlarda doğal östrüs tespiti sabah ve akşam olmak üzere 45 dakikalık iki periyotta arama koçlarıyla yapıldı. Östrüste olduğu belirlenen koyunlar elde sıfat yöntemiyle aynı ırk damızlık bir koç ile çiftleştirildi. Koyunların çiftleştirilme günü, gebelikleri için 0. gün olarak kabul edildi.

Koyunlarda Gebeliğin Teşhisi ve Plazma Örneklerinin Elde Edilmesi

Çiftleştirme sonrası 21. günde (kör örnekleme ile) vena jugularisden vakumlu Na-EDTA içeren tüplere ilk kan örnekleri alındı. Daha sonra 28. günde sırt üstü yatırılan koyunlarda transrektal ultrasonografi (7.5 MHz transrektal prob donanımlı B-Mode Real Time ultrason cihazı; Scanner 480 Vet, Esaote Pie Medical, Maastrich, Hollanda) yapılarak embriyonik kalp atımı görülerek gebe oldukları belirlenen koyunlar çalışmaya dahil edildi ve 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde diğer kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 devir/dakika'da 20 dk santrifüj edildi ve plazma örnekleri eppendorf tüplere

aktarıldı ve PAG'lerin analizine kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Gebeliklerin devamlılığı 35. günde ikinci transrektal ultrasonografiyle teyit edilirken gebelik sürecinin doğum ile tamamlandığı da işletme kayıtlarından tespit edildi. Çalışmaya tek kuzu doğuran koyunlar dahil edildi.

Plazma Örneklerinde PAG Düzeylerinin Belirlenmesi

Laboratuvar analizleri aşamasında plazma örnekleri derin dondurucudan oda ısısı ortamına analizlerin başlamasından 1 saat önce çıkarılarak sıcaklıklarının ortam sıcaklığına erismeleri sağlandı. Daha sonra mikroplyt üzerinde iki pozitif ve iki negatif kontrol kuyucuğu işaretlendi, sonrasında plazma örnekleri örnekleme desenine kayıt edilerek kuyucuklara dağıtıldı. Plazma örneklerindeki PAG'lerin değeri ELISA tabanlı çalışan ticari bir kit kullanılarak belirlendi. Laboratuvar analizleri üretici firmanın kit prospektüsündeki talimatlara uyularak adım adım gerçekleştirildi. Mikroplyt kuyucuklarında reaksiyonun durdurulmasından sonra kuyucuklardaki renk değişimlerini belirlemek amacıyla numunelerin ve kontrollerin optik dansite yoğunlukları 450 nm ve 650 nm referans dalga boylarında, Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBTAM) laboratuvarında bulunan spektrofotometri cihazında (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) belirlendi. Tüm numunelerin ve kontrollerin her birinin düzeltilmiş OD (optimal yoğunluk) değerleri; 450 nm'deki OD değerlerinden 650 nm referans dalga boyundaki OD değerinin çıkarılmasıyla belirlendi. Bu aşamadan sonra numunelerin düzeltilmiş OD değerlerinden, negatif kontrollerin düzeltilmiş ortalama OD değerleri çıkarılarak gebelik tanısı için esas OD (S-N) değeri belirlendi. Her bir numune için belirlenmiş bu değerlerin yorumlanmasında; S-N değeri ≥ 0.30 ise gebelik pozitif, S-N < 0.30 ise gebelik negatif kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arası ve grup

içi ölçümlerin homojenliği test edildi. Çalışmada örnekleme günlerine (gebelik günlerine) ilişkin ortalama OD değerleri en küçük kareler ortalaması±standart hata şeklinde hesaplandı ve istatistiki analizinde tekrarlı ölçümler varyans analizi kullanıldı. Günler arasındaki farklılıkların kontrolü ise bonferroni düzeltilmiş “p” değerleri kullanılarak wilcoxon pairwise testi ile yapıldı. İstatistiksel önemlilik seviyesinde $P<0.05$ esas alındı.

BULGULAR

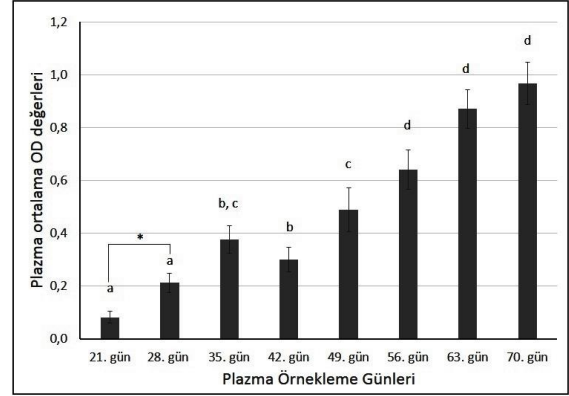
Konya Merinosu koyunlarda plazma ortalama PAG'lerin OD değerlerinin; gebeliğin 21-70. günleri arasında doğrusal olarak arttığı belirlendi. Gebeliğin 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerinde koyunların plazmalarında belirlenen ortalama PAGs-OD değerleri Tablo 1'de verildi, bu değerlerin sütun grafiği ise Şekil 1'de gösterildi.

Tablo 1. Örnekleme günlerinde ortalama plazma PAG'lerin OD değerleri ve PAG'lerin pozitif değerlerinin yüzdeleri.

Table 1. Mean plasma OD values of PAGs and percentages of the positive value of PAGs on sampling days.

Örnekleme günü	n	Plazma PAG OD değeri (X±Sx)	≥0.03 OD oranı (Sensivite)
21	13	0.08±0.02 ^a	7.69 (1/13)
28	13	0.21±0.04 ^a	30.77 (4/13)
35	13	0.38±0.05 ^{bc}	69.23 (9/13)
42	13	0.30±0.05 ^b	61.54 (8/13)
49	13	0.49±0.08 ^c	76.92 (10/13)
56	13	0.64±0.07 ^d	92.31 (12/13)
63	13	0.87±0.07 ^d	100.0 (13/13)
70	13	0.97±0.08 ^d	100.0 (13/13)

Tabloda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. a, b, c, d: $P<0.05$. OD: Optimal yoğunluk; PAGs: Gebelik ilişkili glikoproteinler.



Şekil 1. Örnekleme günlerinde ortalama plazma PAG'lerin OD değerleri.

Figure 1. Mean plasma OD values of PAGs on sampling days.

Gebeliğin 21 ve 28. günlerindeki PAG'lerin ortalama OD değerleri arasındaki istatistiksel önem farklılığının 0.07 düzeyinde olduğu tespit edildi.

Çalışmada ilk örneklemenin yapıldığı 21. güne göre, ortalama PAG'lerin OD değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli düzeydeki ilk farklılık 35. günde oldu ($P<0.05$). Gebeliğin 35 ve 42. günlerindeki ortalama PAG'lerin OD değerleri arasında istatistiksel düzeyde farklılık oluşmazken ($P>0.05$), 49. gündeki ortalama PAG'lerin OD değeri 42. gündeki ortalama PAG'lerin OD değerine, 56. gündeki ortalama PAG'lerin OD değeri ise 49. gündeki ortalama PAG'lerin OD değerine göre önemli düzeyde artış gösterdi ($P<0.05$). Gebeliğin 56, 63 ve 70. günlerindeki ortalama PAG'lerin OD değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel düzeyde önemli bulunmadı ($P>0.05$). Ancak, gebeliğin 35. gününden sonraki her PAG'lerin OD ortalama değeri ise gebeliğin 21 ve 28. günlerindeki PAG'lerin OD değerlerinden önemli düzeyde farklı bulundu ($P<0.05$).

Plazma örnekleme günlerinde, S-N değeri ≥ 0.30 olan koyunların oranı Tablo 1'de verildi. Plazma ortalama PAG'lerin OD değeri 21 ve 28. günlerde 0.3 değerinden düşük tespit edildi. Gebeliğin 35. gününde plazma ortalama PAG-OD değeri 0.38 belirlendi ve bundan sonraki örnekleme günlerinde plazma ortalama PAG-OD ≥ 0.30 oldu. S-N değeri ≥ 0.30 olan koyunların oranı da ortalama PAG'lerin OD

değerlerine paralel olarak artarak devam etti ve 28, 35 ve 42. günde S-N değeri ≥ 0.3 olan koyun oranı sırasıyla; %30.77, %69.23 ve %61.54 oldu, 63. günde %100'e ulaştı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ruminantlarda PAG'lerin periferik kan dolaşımındaki profilinin tür ve ırk düzeyinde değişebileceği, bu moleküllerin profilinin belirlenmesinin gebelik fizyolojisi ve patolojilerine ilişkin temel bilgiler sağlayabileceği belirtilmektedir (15). Bu çalışmada da, *Konya Merinosu* koyunlarda gebeliğin maternal kabulü sürecinin hemen sonrasında başlayarak plasentasyonun tamamlanmasına kadar olan gebelik döneminde PAG'lerin plazma profili haftalık ölçümlerle belirlendi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; *Konya Merinosu* koyunlarda gebeliğin 21. gününden başlayarak 70. gününe kadar 7 gün aralıklarla yapılan örneklemelerle plazma PAG'lerin konsantrasyonunun doğrusal olarak arttığı görüldü. Koyunlarda embriyo, gebeliğin başlangıcında histiyotrofik, sonrasında bu beslenme yoluna ek olarak, oluşan kotiledon, sindesmokoryal, intermedial özelliklerdeki plasentanın oluşumuyla esas beslenme yolu olan hemotrofik yolla beslenir (2,16). Koyunlarda plasentanın oluşumuna kadar olan gebelik süreci; hızla büyüyen ve gelişen embriyo/fötüsün ihtiyaçlarını karşılamak üzere özellikle hemotrofik beslemeye geçiş hızlandırmak amacıyla plasental dokuda hızlı büyüme, plasental transportun artarak geliştiği ve yoğun bir yapılanma şeklinde dinamik değişikliklerin olduğu süreçtir (17-19). Embriyonun zona pellusidadan çıkmasını takiben, PAG'leri sentezleyen ve granüller içerisinde salgılayan mononükleer ve binükleer trofoblastik hücrelerin sayısında ve hacimlerindeki artışla başlayan plasentasyon süreci, mikrovillusların kan damarlarından zengin karunkulalar içerisine doğru yaptığı derin ve dallanmış girintilerle oluşturduğu, feto-maternal kan değişiminin gerçekleştiği plasentomların oluşumuyla tamamlanmaktadır (2). Progresif özellikteki bu süreçte mikrovilluslar

aracılığıyla endometriyum ve koryon arasındaki temas yüzeyindeki artışla birlikte karunkulalardaki kan akımı da artmaktadır. Plasentasyondaki bu gelişmelerle, PAG'lerin sentezlendiği mononükleer ve binükleer hücrelerin hipertrofisi ve sayısındaki artış; PAG'lerin daha fazla salgılanması ve maternal kan dolaşımına plasental ürünlerin transportunu kolaylaştırdığından gebelik ilerledikçe maternal kan plazmasında PAG moleküllerinin konsantrasyonlarındaki doğrusal artışın açıklanmasına dayanak oluşturmaktadır. Bununla birlikte; bu çalışmada elde edilen sonuçlar, daha önce *Konya Merinosu* koyunlarda PAG'lerin plazma profilini gösteren Uçar ve ark.'nın (20) bildirişleriyle ve bu çalışmada kullanılan PAG-ELISA ticari kitini kullanarak koyunlarda gebeliğin 30-120. günleri arasında PAG'lerin profilini gösteren Robert ve ark.'nın (10) bildirişleriyle uyumludur.

Çiftlik hayvanlarında gebelik sürecinin izlenmesinde kullanılacak biyomarkırların; non-invaziv veya çok az invaziv yolla elde edilecek örneklerle, besleme, ilaç ve çevresel faktörlerden etkilenmeden, kısa sürede yapılan analizlerle, konseptusun yaşını ve canlılığını ifade edebilme özelliğinde olması gerekmektedir (21). Sunulan bu çalışmada gebelik yaşı ilerledikçe plazma PAG'lerin konsantrasyonunun doğrusal artması hem plasenta gelişiminin hem de yavru gelişiminin indirekt izlenmesinde iyi bir indikatör olduğunu işaret etmektedir. Zira yavrunun gelişiminin, plasentanın ağırlığının, gebelik sıvılarının ve plasentomların büyüklüğünün gebelik yaşıyla uyumlu olarak arttığı koyun, keçi ve ineklerde daha önce yapılan postmortem veya ultrasonografik çalışmalarla gösterilmiştir (17,22-28).

Bu çalışmada kullanılan ölçüm kiti, sığırlarda erken gebelik tanısı için geliştirilmiş bir kit olmakla birlikte PAG'lerin evrim süresince çok iyi korunması ve sığır ve koyunlar arasında PAG'leri kodlayan genlerin homologları arasındaki %70'in üzerindeki benzerlik, türler arasında çapraz reaksiyonların oluşumuna imkan sağladığından inekler için geliştirilmiş bu kitin koyunlarda da kullanımına imkan

sağlamaktadır (9,10). Sunulan bu çalışmada gebeliğin 35. gününde plazma ortalama PAG-OD değeri 0.38 ± 0.05 ölçüldü. Bu değer, ELISA-PAG kitinin prospektüsünde pozitif gebelik tanısı için kabul edilen ≥ 0.300 değerinden büyüktür. Ancak 35. günde plazma PAG-OD değeri ≥ 0.300 değerinden yüksek olan koyun oranı, kit prospektüsünde 35. günde koyun serumu için belirtilen sensitivite değerinden (%100) oldukça düşüktür. Steckeler ve ark. (29), 35 ve 43. günlerde yapılan ultrasonografi sonuçlarına göre gebe koyunlarda plazma örneklerindeki PAG'lere ilişkin sensitivite değerinin 42. günde %100 ulaştığını, ancak 49. günde %63.6 oranına gerilediğini, tekrar %100 oranına ise; bizim çalışmamızda olduğu gibi, 63. günde ulaştığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise gebeliğin 49. gününde ≥ 0.300 değerinden yüksek plazma PAG-OD değeri belirlenen koyun oranı, Steckeler ve ark.'nın (29) bildirdiği orandan biraz yüksek, %76.92 oldu. Genel olarak, bizim çalışmamızın sonuçları, Steckeler ve ark.'nın (29) sonuçlarıyla uyumludur ve plazma PAG-OD profilleri benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte 35. günde plazma ortalama PAG'lerin OD değerinin 0.38 ± 0.05 ölçülmesi, pozitif gebelik tanısı için kabul edilen ≥ 0.300 değerinden daha büyük değerlere sahip olan koyunların olduğunu göstermektedir. Hem bu bulgu hem de koyunların tamamında bireysel plazma PAG'lerin OD değerinin ≥ 0.300 üzerine çıkışının; ilk örnekleme gününün plasentasyonun tamamlandığı 60. günden sonra 63. gün olarak belirlenmesi; pozitif gebelik tanısı için alt sınır kabul edilen değerin ≥ 0.300 'ün üzerine çıkmasında koyunlar arasında bireysel farklılıkların çok önemli etkisinin olduğuna işaret etmektedir. Bu bulguya benzer bir sonuç da monoklonal ELISA-PAG kiti kullanarak aynı ırk koyunlarda çalışan Uçar ve ark. (20) tarafından bildirilmiştir.

Günümüzde saha şartlarında koyunlarda gebelik tanısı amacıyla en yaygın kullanılan teknik transabdominal ultrasonografi tekniğidir. Transrektal ultrasonografiyle gebelik daha erken dönemde belirlenebilmesine karşın, oluşturduğu çeşitli komplikasyonlar ve daha fazla iş gücü ve zaman

gerekliliği, 3-5 gün daha gecikmeli gebelik tanısı yapılabilen transabdominal ultrasonografi seçeneğini ön plana çıkarmaktadır (24). Ancak, transabdominal uygulama için en ideal günlerin 40-75. günler arası olduğu ifade edilmektedir (30). Bu nedenlerden dolayı her ne kadar bu çalışmada plazma örnekleriyle koyunlarda gebelik tanısı gecikmiş gibi görünse de; örneklerin toplanması, saklanması ve ölçümler için çok donanımlı alet-cihaz gerektirmemesi, örneklerin analize kadar sonuçlar etkilenmeden saklanabilmesi gibi önemli avantajlar, sığır ELISA-PAG kitini koyunlarda gebelik tanısı için ultrasonografiye alternatif yapmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen önemli sonuçlardan birkaçı; plazma ortalama PAG-OD değerinin 42. günde 35. gündeki değere göre önemli düzeyde olmamakla birlikte hafif bir düşüş göstermesi, 49. gündeki plazma ortalama PAG-OD değerinin 42. gündeki değere göre önemli düzeyde artış göstererek binominal bir ekspresyon profili oluşturmasıdır. Benzer bir bulgu Steckeler ve ark. (29) tarafından bizim çalışmamızda olduğu gibi haftalık örnekleme yapılan güncel bir çalışmada elde edilmiştir. Steckeler ve ark. (29) çalışmalarında plazma örneklerinden yapılan görsel PAG-ELISA testinde; gebe koyunların oranında 49. günde bir düşme olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte daha önce ineklerde de PAG'lerin ekspresyonlarında binominal ekspresyon olduğu gösterilmiştir (31). Bizim çalışmamızda da 42. gündeki plazma PAG-OD değerindeki düşüşün plasenta fonksiyonundaki hızlı değişimler, bu evrede plasental büyümenin hızlı olması ve artmış plasental taşınım ve yeniden yapılanma gibi gebeliğin dinamik değişimlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmekle birlikte ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; Konya Merinosu koyunlarda plazma PAG'lerin profilinin gebelik yaşıyla uyumlu olarak artış gösterdiği kanısına varıldı. Ancak, sığır ELISA-PAG kitiyle koyunlarda plazma örnekleriyle plasentasyonun tamamlanma süreciyle çok yüksek güvenilirlikle gebelik tanısı yapılabileceği kanısına varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmada kullanılan plazma örneklerinin toplanmasında gösterdikleri gayretlerinden dolayı Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü yönetimi ve çalışanlarına teşekkür eder.

KAYNAKLAR

1. Abbot P., Rokas A., 2017. Mammalian pregnancy. *Current Biol*, 27, 127-128.
2. Chavatte-Palmer P., Tarrade A., 2016. Placentation in different mammalian species. *Ann Endocrinol*, 77, 67-74.
3. Carter AM., Mess AM., 2017. The evolution of fetal membranes and placentation in carnivores and ungulates (Ferungulata). *Anim Reprod*, 14, 124-135.
4. Roberts RM., Green JA., Schulz LC., 2016. The Evolution of the Placenta. *Reproduction*, 152, 179-189.
5. Sammin D., Markey B., Bassett H., Buxton D., 2009. The ovine placenta and placentitis- A review. *Vet Microbiol*, 135, 90-97.
6. Igwebuike UM., 2009. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, 112, 1-7.
7. Szafranska B., Panasiewicz G., Majewska M., 2006. Biodiversity of multiple Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia)-a review. *Reprod Nutr Dev*, 46, 481-502.
8. Sousa NM., Ayad A., Beckers JF., Gajewski Z., 2006. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. *J Physiol Pharmacol*, 57, 153-171.
9. Wallace RM., Pohler KG., Smith MF., Green JA., 2015. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction*, 149, 115-126.
10. Roberts JN., May KJ., Veiga-Lopez A., 2017. Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. *Theriogenology*, 89, 271-279.
11. Resmi Gazete, 2017. 28.12.2017 tarih ve 26740 sayılı gazete, 2007/52 nolu tebliğ, Ek-34, Orta Anadolu Merinosu.
12. Kaymakçı M., Taşkın T., 2008. Türkiye koyunculığında melezleme çalışmaları. *Hayvansal Üretim*, 49, 43-51.
13. TAGEM, 2009. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları. 1. baskı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Aralık 2009, Ankara.
14. Sousa NM., Garbayo JM., Figueiredo JR., Sulon J., Goncalves PB., Beckers JF., 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Rumin Res*, 32, 137-147.
15. El Amiri B., Karen A., Sulon J., Melo de Sousa N., Alvarez-Oxiley A., Cognie Y., Szenci O., Beckers JF., 2007. Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during early pregnancy in Lacaune sheep. *Reprod Dom Anim*, 42, 257-262.
16. Spencer TE., Bazer FW., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol and Endocrinol*, 2, 1-15.
17. Wallace JM., Da Silva P., Aitken RP., Cruickshank MA., 1997. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol*, 155, 359-368.
18. Johnson GA., Burghardt RC., Bazer FW., 2014. Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep. *J Anim Sci Biotechnol*, 5, 1-15.
19. Imakawa K., Bai R., Fujiwara H., Kusama K., 2016. Conceptus implantation and placentation: molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reprod Med Biol*, 15, 1-11.

20. Uçar U., Köse M., Atlı MO., 2018. Konya Merinosu koyunlarda gebelik ilişkili glikoproteinlerin gebelikteki plazma profili ve erken gebelik tanısında kullanılabilirliği. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 11, 77-82.
21. Balhara AK., Gupta M., Singh S., Mohanty AK., Singh I., 2013. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *Scientific World J*, 5, 1-10.
22. Bazer FW., Spencer TE., Thatcher WW., 2012. Growth and development of the ovine conceptus. *J Anim Sci*, 90, 159-170.
23. Ehrhardt RA., Bell AW., 1995. Growth and metabolism of the ovine placenta during mid-gestation. *Placenta*, 16, 727-741.
24. Jones AK., Reed SA., 2017. Benefits of ultrasound scanning during gestation in the small ruminant. *Small Rum Res*, 149, 163-171.
25. Patel OV., Sulon J., Beckers JF., Takahashi T., Hirako M., Sasaki N., Domeki I., 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur J Endocrinol*, 137, 423-428.
26. Erdoğan G., 2012. Ultrasonic assessment during pregnancy in goats-A Review. *Reprod Dom Anim*, 47, 157-163.
27. Gonzalez de Bulnes A., Santiago Moreno J., Lopez Sebastian A., 1998. Estimation of foetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. *Small Rumin Res*, 27, 243-250.
28. Gürler H., Kaymaz M., 2011. Akkaraman ırkı koyunlarda transrektal ve transabdominal muayene tekniği kullanılarak embriyonik ve fetal yaşın belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 58, 99-104.
29. Steckeler P., Weber F., Zerbe H., Rieger A., Voigt K., 2019. Evaluation of a bovine visual pregnancy test for the detection of pregnancy-associated glycoproteins in sheep. *Reprod Dom Anim*, 54, 280-288.
30. Erdem H., Sarıbay MK., 2019. Gebelik ve tanı yöntemleri "Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji", Editörler: Mustafa Kaymaz, Murat Fındık, Ali Rişvanlı, Afşin Köker, 3. Baskı, 441-452, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, Malatya.
31. Thompson IM., Tao S., Branen J., Ealy AD., Dahl GE., 2013. Environmental regulation of pregnancy-associated glycoprotein B concentrations during late pregnancy in dairy cattle. *J Anim Sci*, 91, 168-173.



Katıfaz Fermentasyonu ile Arpanın Besin Değerinin İyileştirilmesi*

Şaziye Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ^{1a}✉, Büşra DUMLU^{2b}, Royale AHMADOVA^{1c}

1. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE.

2. Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Hayvansal Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Muş, TÜRKİYE.

ORCID: 0000-0003-1153-3489^a, 0000-0002-3339-1322^b, 0000-0002-6547-2872^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
01.08.2019	27.11.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Bölükbaşı Aktaş ŞC, Dumlu B, Ahmadova R: Katıfaz Fermentasyonu ile Arpanın Besin Değerinin İyileştirilmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 315-323, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.599762.

Öz: Bu çalışmada, nar kabuğu (NK) ilave edilerek peynir altı suyu (PAS) ile katı faz fermentasyonuna tabi tutulan arpanın (A) besin madde içeriğinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Denemede dört grup oluşturulmuş, birinci grup A + PAS + %0,5 NK, ikinci grup A + PAS + %1 NK, üçüncü grup A + PAS + %1,5 NK ve dördüncü grup A + PAS + %2 NK şeklinde oluşturulmuştur. Karışımlar arpaya sırasıyla 0.5, 1, 1.5 ve 2 g nar kabuğu ilave edilerek 100 g'a tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. Her grup onbeş tekerrürden oluşmuştur. Hazırlanan karışımlar 500 ml'lik erlenmayerlere konulmuş ve üzerlerine 120 ml peynir altı suyu ilave edilerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Her grup için hazırlanan 15 adet erlenmayerden 5 adedi fermente edilmeden oda sıcaklığında kurutulmuştur. Geriye kalan erlenmayerlerin yarısı 32±2 °C'de inkübatörde 24 saat diğer yarısı ise 48 saat süreyle fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon sonrası hem fermente yemlerin hem de fermente edilmeyen yemlerin kuru madde, ham protein, ham yağ, ham kül, ham selüloz, antioksidan aktiviteleri ve maya (*Saccharomyces cerevisiae*) sayıları belirlenmiştir. Bu çalışmada, fermente yemlerin ham protein ve ham kül oranlarının önemli derecede arttığı, ham yağ oranlarının ise azaldığı tespit edilmiştir. Fermente edilen arpanın maya içeriği ve antioksidan aktivitesinin önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak arpaya fonksiyonel özellik kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arpa, Katı faz fermentasyonu, Maya, Nar Kabuğu, Peyniraltı suyu.

Improving the Nutritional Value of Barley by Solid State Fermentation

Abstract: In this study, it was aimed to determine the effect of solid state fermentation with whey (W) on nutrient composition of pomegranate peel (PP) supplemented barley (B). Experiment was conducted with four groups such as the 1st group B+W+0.5% PP, the 2nd group B+W+1% PP, the 3rd group A+W+1.5% PP and the 4th group A+W+2% PP, respectively. The mixtures were prepared to complete 100 grams of barley with 0.5, 1, 1.5 and 2 grams of pomegranate peel (PP). Each group consisted of fifteen replicates. Prepared mixtures were placed in 500 ml erlenmayers and 120 ml whey was added and then mixed homogeneously. Five of the erlenmayers prepared for each group without being fermented were dried at room temperature. Half of the remaining erlenmayers were fermented in the incubator at 32 ± 2 °C for 24 hours and the other half for 48 hours. After fermentation, dry matter, crude protein, ether extract, crude ash, crude fiber, antioxidant activities and yeast numbers were determined in fermented and non-fermented feed samples. This study, crude protein and crude ash ratios of fermented feeds increased significantly and ether extract ratios decreased. The fermented barley had a significant increase in the yeast content and antioxidant activity. Finally, the functional properties of barley have been gained.

Keywords: Barley, Pomegranate peel, Solid state fermentation, Whey, Yeast.

✉ Şaziye Canan Bölükbaşı Aktaş

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE.

e-posta: canan@atauni.edu.tr

*Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2015/407

GİRİŞ

Kanatlı beslemede enerji yemleri arasında kullanılan arpanın kullanımında sınırlamalar vardır. Bunun en önemli nedeni ise, hayvan performansı üzerine negatif etki yaratan nişasta tabiatında olmayan polisakkaritlerdir. Buna ilaveten, kanatlılarda fitaz enzimi az salgılandığı için bitkisel kaynaklı fosfordan (fitin) kanatlılar çok az yararlanır. Nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri ve fitin fosforunu parçalayan enzimler, özellikle büyümekte olan kanatlılar tarafından çok az salgılandığından, bu yemlerden yararlanma oranı da azalır. Bu nedenle, büyüyen kanatlılarda bu yemlere dayalı rasyonlar kullanıldığı zaman yemlere enzim katılmakta veya tahılların besleme değerini artırmak için ıslatma (1) ve fermentasyon (2) teknikleri kullanılmaktadır.

Fermentasyon işlemi yemlerin veya yan ürünlerin hayvanlar için daha yararlı hale getirilmesini sağlayan biyoteknolojik bir süreçtir. Bu süreçte kimyasal kullanımına gerek olmayıp çiftlik şartlarında bile çok rahat uygulanabilmektedir. Bu yöntemle yemlerdeki antibesinsel faktörler azaltılabilmekte, yemin protein değeri artırılabilen, besin sindirilebilirliği iyileştirilebilmektedir (3,4,5). Katı faz fermentasyonu kendine has özellikleri olan, düşük maliyetli ekipmanlar kullanımına uygun, yüksek miktarda verim etkinliğine sahip ve düşük işletim maliyeti olan biyolojik ve fonksiyonel ürün üretimi için uygun ve modern bir yöntemdir (6,7). Çalışmada katı faz fermentasyonunda endüstriyel bir yan ürün olan ve hayvan besleme için değerli ve fonksiyonel biyolojik moleküller içeren yüksek miktarda antioksidan kapasitesine sahip nar kabuklarından faydalanılmıştır. Ülkemizde yaklaşık üretim miktarı 518.000 ton olan narın büyük bir kısmı meyve suyu üretiminde kullanılmakta olup, üretim aşamasında bunun yaklaşık %48'lik yararlanılamayan bir kısmı ortaya çıkmaktadır. Tohum ve kabuktan oluşan yararlanılamayan kısım polifenoller, ellajik asit, vitaminler ve çoklu doymamış yağ asitlerince zengin biyoaktif bileşenler içermektedir (8,9). Bu

kısımlar antioksidan, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiye sahiptirler.

Çalışmada fermentasyon için nar kabuğunun yanında saf protein ve mineral madde bakımından zengin diğer bir yan ürün olan peynir altı suyu kullanılmıştır. Peynir üretiminin yan ürünü olan peynir altı suyu kimyasal, fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra biyolojik değeri yüksek olan proteinler bakımından zenginlik göstermektedir. Peynir altı suyu beslenme açısından önemli olduğu kadar, aminoasitlerin denge kaynağı olması yönünden de önem taşımaktadır (10).

Bu çalışmada arpanın katı-faz fermentasyon metodu kullanılarak antioksidan değeri yüksek olan nar kabuğu ve saf protein ve minerallerce zengin olan peynir altı suyu gibi endüstriyel yan atıklar ile fermente edilerek besin madde içeriklerinin artırılması ve kanatlı hayvanlar için daha faydalı olabilecek fonksiyonel bir yem maddesi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Fermentasyon işlemi öncesinde arpa (A) ve nar kabukları (NK) öğütülerek 3 mm'lik bir elekten geçirilmiştir. Çalışma grupları, birinci grup A (arpa)+ PAS (peynir altı suyu) +%0.5 NK (nar kabuğu), ikinci grup A +PAS+ %1 NK, üçüncü grup A +PAS+ %1.5 NK ve dördüncü grup A+PAS+ %2 NK şeklinde oluşturulmuştur. Çalışmada, arpaya sırasıyla 0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 g nar kabuğu (NK) ilave edilerek 100 gr'a tamamlanmıştır. Katı faz fermentasyonunun gerçekleşmesi ve mayaların gelişip çoğalabilmesi için gerekli olan nemin (optimum %66) ayarlanması için besin madde kompozisyonu yüksek ve peynir üretiminin yan ürünü olarak meydana gelen fakat herhangi bir şekilde değerlendirilmeyen peynir altı suyundan yararlanılmıştır. Karışımlara 120 ml peynir altı suyu ilave edilerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Böylece karışımın nem oranı katı faz fermentasyonu için ideal olan nem oranına (ortalama %66 olarak, 120 ml peynir altı suyu + %10.5 arpanın

nem içeriği) ayarlanmıştır. Her grup onbeş tekerrür olacak şekilde hazırlanıp 500 ml'lik erlenmayerlere konulmuştur. Her grup için hazırlanan erlenmayerlerden 5 adedi fermentasyona tabi tutulmadan naylon örtü üzerine boşaltılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Geriye kalan erlenmayerlerin ağızları pamukla kapatılarak yarısı (her gruptan beş adet) 24 saat süreyle diğer yarısı ise 48 saat süreyle *Saccharomyces cerevisiae* mayasının gelişiminin sağlanması için 32 ± 2 °C de inkübatörde fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon sonrası yem örnekleri boşaltılarak gölgede oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra yemlerde ham protein (HP), ham yağ (HY), ham selüloz (HS), ham kül (HK) ve kuru madde (KM) analizleri Wendee analiz yöntemine göre (11), antioksidan aktivitesi (12) ve maya sayımı (13) yapılmıştır. Araştırmada kullanılan arpa, nar kabuğu ve peynir altı suyuna ait besin değerleri Tablo 1. de sunulmuştur.

Tablo. 1. Denemede kullanılan arpa, nar kabuğu ve peynir altı suyunun besin madde kompozisyonu (%).
Table 1. Nutrient composition of barley, pomegranate peel and whey used in the experiment (%).

Yemler	KM	HP	HY	HK	HS
Arpa	89.5	11.1	3.7	3.7	3.1
Nar Kabuğu	77.9	3.5	2.6	4.2	11.9
Peynir altı suyu	6.6	1	0.8	0.5	-

KM: Kuru madde, HP: Ham protein, HY: Ham yağ, HK: Ham kül, HS: Ham selüloz

İstatistiksel Analiz

Araştırma materyali yemlerin besin madde içeriklerine ait verilerin analizleri Genel Linear Model prosedürü ile SPSS 17.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında önemli bulunan ortalamaların önem kontrolleri Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir (14).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Arpanın nar kabuğu ilave edilerek peynir altı suyu ile karıştırılıp fermentasyon öncesi (0. saat) ve fermentasyonun 24 ve 48. saatindeki kuru madde, ham protein, ham yağ, ham kül ve ham selüloz analiz sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde fermentasyon öncesi (0.saat) KM, HP, HY, HK ve HS değerleri bakımından gruplar arasında önemli derecede farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Fermentasyonun 24. saatinde KM, HP, HY ve HK bakımından gruplar arasında fark önemli bulunmazken ham selüloz bakımından bu farkın önemli ($P<0.05$) olduğu ve en düşük ham selüloz değerinin A+ PAS+ %0.5 NK grubunda olduğu belirlenmiştir. Fermentasyonun 48. saatinde yine kuru madde, ham protein ve ham kül bakımından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Ancak ham yağ ve ham selüloz bakımından önemli derecede farklılık olduğu, en düşük ham yağ oranının A+PAS+%1 NK grubunda, en düşük ham selüloz değerinin ise A+PAS+%0.5 NK grubunda olduğu tespit edilmiştir.

Fermentasyon süresinin arpanın besin madde kompozisyonu üzerine etkisi incelendiğinde kuru madde bakımından herhangi bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Yemlerin ham protein ve ham kül değerlerinin fermentasyon süresine bağlı olarak önemli derecede arttığı, en yüksek ham protein değerinin fermentasyonun 24.saatinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Ham yağ ve ham selüloz değerlerinin de fermentasyon süresinden etkilendiği bulunmuş, fermentasyon süresine bağlı olarak ham yağ değerinde önemli düzeyde azalma görülmüştür. Ham selüloz değerinin ise yalnızca fermentasyonun 24.saatinde önemli düzeyde ($P<0.05$) azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 2. Fermentasyon öncesi ve sonrası yemlerin besin madde kompozisyonu (%).
Table 2. Nutrient composition of feed before and after fermentation (%).

Süre	Yemler	Kuru madde	Ham protein	Ham yağ	Ham selüloz	Ham kül
0.saat	A+PS+% 0.5 NK	89.70	11.87	4.01	3.17	4.01
	A+PS+% 1 NK	90.11	11.93	4.11	3.23	4.12
	A+PS+% 1.5 NK	90.25	12.01	3.99	3.28	4.10
	A+PS+% 2 NK	91.03	11.67	4.26	3.36	4.23
	SEM	0.32	0.39	0.10	0.25	0.18
	P	ÖS	ÖS	ÖS	ÖS	ÖS
24.saat	A+PS+% 0.5 NK	90.57	14.07	2.31	2.03 ^b	4.44
	A+PS+% 1 NK	91.88	14.10	2.70	3.01 ^a	4.44
	A+PS+% 1.5 NK	91.82	12.74	2.45	3.43 ^a	4.58
	A+PS+% 2 NK	91.86	15.44	2.61	3.27 ^a	4.77
	SEM	0.32	0.59	0.09	0.18	0.12
	P	ÖS	ÖS	ÖS	0.03	ÖS
48.saat	A+PS+% 0.5NK	92.09	13.77	2.26 ^a	2.60 ^b	4.62
	A+PS+% 1NK	92.11	13.27	1.95 ^b	3.59 ^{ab}	4.88
	A+PS+% 1.5NK	91.99	13.32	2.40 ^a	3.38 ^{ab}	4.79
	A+PS+% 2NK	91.93	15.14	2.52 ^a	4.01 ^a	4.84
	SEM	0.121	0.32	0.076	0.19	0.20
	P	ÖS	ÖS	0.018	0.050	ÖS
Fermentasyon Süresi	0.saat	90.27	11.87 ^c	4.09 ^a	3.26 ^a	4.12 ^b
	24.saat	91.45	14.09 ^a	2.52 ^b	2.93 ^b	4.56 ^a
	48.saat	92.03	13.87 ^b	2.28 ^b	3.40 ^a	4.78 ^a
	SEM	0.42	0.39	0.08	0.27	0.23
	P	ÖS	*	*	*	*
Nar Kabuğu Seviyesi	%0.5 NK	90.78	13.24 ^b	2.86	2.60 ^b	4.36
	%1 NK	91.36	13.10 ^b	2.92	3.28 ^a	4.48
	%1.5 NK	91.35	12.69 ^c	2.95	3.36 ^a	4.49
	%2 NK	91.61	14.08 ^a	3.13	3.55 ^a	4.61
	SEM	0.28	0.41	0.08	0.20	0.26
	P	ÖS	0.050	ÖS	0.010	ÖS
Fermentasyon Süresi x Nar Kabuk Seviyesi		ÖS	ÖS	ÖS	ÖS	ÖS

a-b: Bir sütündeki farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır. A:Arpa PS: Peynir altı suyu NK: Nar kabuğu, ÖS: Önemli
 * P<0.05

Baran (15), *L. salivarius* ile katı faz fermentasyonuna tabi tuttuğu arpa, buğday ve yulafın kuru madde oranlarında önemli derecede değişimler olduğunu bildirmiştir. 48 saatlik fermentasyon sonucunda buğday ve yulafın kuru madde miktarının önemli düzeyde azaldığını, arpanın kuru madde oranının ise önemli derecede arttığını tespit etmiştir. Ancak bu çalışmada kuru madde oranının fermentasyon süresinden etkilenmediği belirlenmiştir. Yaşar (16), peynir altı suyu fermentasyonuna tabi tuttuğu narenciye posalı arpa, buğday ve yulafın kuru madde oranında herhangi bir

değişiklik olmadığını rapor etmiştir. Fermentasyon sonrası yemlerin ham kül oranındaki artış maya sayısında meydana gelen artışla ilişkilendirilmiştir. Çünkü mayalar kuru madde üzerinden yaklaşık %6-9 arasında ham kül içermektedir. Mayaların içerdiği ham külün büyük bir kısmını fosfor oluşturmakta ve bunu sırasıyla K, Mg, Ca, Na takip etmektedir. Maya külünde az miktarda demir, silisyum ve kükürt, iz miktarda ise bakır ve çinko bulunmaktadır (17). Yaşar (16), peynir altı suyu ile fermente ettiği arpa, yulaf ve buğdayın, Baran (15) ise *Lactobacillus salivarius* ile fermente ettiği arpa, buğday ve yulafın ham kül

oranının önemli derecede yükseldiğini belirtmiştir. Ayrıca, altı farklı maya suşu ile fermente edilen soyadan elde edilen "Okora" adlı ürünün ham kül oranında %3-25 arasında değişen bir artış olduğu bildirilmiştir (18). Benzer olarak, Shi ve ark. (19), *Bacillus subtilis* ve *Enterococcus faecium* ile fermente ettikleri mısır-soya karışımı yemin ham kül oranında önemli derecede bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilen soya fasulyesi küspesinin ham kül miktarının 61 g/kg'dan 71 g/kg'a çıktığı bildirilmiştir (20).

Mevcut çalışmada fermentasyona bağlı olarak yemlerin yağ oranının düştüğü görülmüştür. Benzer olarak, Rashad ve ark. (18) farklı maya suşları ile fermente edilen soya fasülyesi yan ürünü Okora'nın ham yağ miktarında önemli düzeyde azalma olduğunu, *S. cerevisia* ile fermente edilen ürünün ham yağ oranında ise -%6.67 düzeyinde bir azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Daha önce yapılan birçok çalışmada farklı mikroorganizmalar ile fermente edilen farklı yemlerin ham yağ düzeyinde azalmalar olduğu bildirilmiştir (21,22). Mayaların yaklaşık olarak %1-7'si yağ ve benzeri maddelerden ibarettir (17). Ekmek mayasında bu oranın %2 ile %23.67 arasında olduğu bildirilmiştir. Mayalardaki yağ oranı mayanın beslenme durumuna göre değişiklik göstermektedir. İyi beslenmiş mayalarda yağ miktarı fazla olmasına rağmen, yeterince beslenememiş mayalarda az veya hiç bulunmamaktadır. Yüksek ısı, fazla havalandırma ve bol besin maddesi maya hücresinde yağ miktarını artırmaktadır (17). Bu çalışma ile benzer olarak, Baran (15), *Lactobacillus salivarius* ile fermente ettiği arpa, buğday ve yulafın ham yağ oranlarının önemli düzeyde değiştiğini, buğday ve yulafın ham yağ oranının arttığını ancak arpada azalma olduğunu tespit etmiştir.

Bu çalışmada fermentasyon süresine bağlı olarak ham protein oranının önemli derecede arttığı görülmüştür. Benzer olarak, Yaşar (16) da peynir altı suyu ile fermente ettiği arpa, yulaf ve buğdayın ham protein oranında bir miktar artış olduğunu tespit etmiştir. Rashad ve ark. (18), "Okora" adlı soya yan

ürününü altı farklı maya suşu ile fermente edip ham protein oranlarını incelemişlerdir. Fermente ürünün ham protein oranının kontrol yemine göre %54 düzeyde artış gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ham protein oranındaki bu artışın sebebini fermentasyon sırasında ortamdaki maya sayısındaki artışın hızlı olmasına bağlamışlardır. Moore ve ark. (23), üç farklı ticari maya ile fermente ettikleri buğday kepeğinde fermentasyon sonrası ham protein oranının %11-12 düzeyinde arttığını ve bu artışın ortamdaki maya sayısındaki artıştan kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Mathot ve ark. (24), *Aspergillus niger* ile katı faz fermentasyonu sonucunda arpanın ham protein oranında görülen artışın proteaz aktivitesinde meydana gelen artıştan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Söz konusu çalışmada beklentiler doğrultusunda fermentasyon sonrası yemlerin ham protein oranında ve maya sayısında artışlar kaydedilmiştir. Genel olarak taze mayanın %20-30 oranında kuru madde içerdiği ve bu kuru maddenin de yaklaşık %45-60'ının ham proteinden oluştuğu bildirilmiştir (17). Mayaların vücut bileşenlerinin önemli düzeyde protein içermesi analiz sonuçlarındaki ham protein oranındaki artışın sebebi olarak gösterilebilir.

Mevcut çalışmada arpanın ham selüloz oranının fermentasyonun 24. saatinde azaldığı ancak 48. saatte yine arttığı tespit edilmiştir. Rashad ve ark. (18), soya yan ürünü maya suşları ile fermente edilmesi sonucu ham selüloz oranında %45'e kadar; *S. cerevisiae* ile fermentasyonunda ise %7.38 oranında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (22). Buğday kepeği ve pancar talaşının *Neurospora sitophila* ile fermentasyonu sonucu buğday kepeği (%54.5) ve pancar talaşındaki (%75) selülözün büyük bir kısmının parçalanarak protein biyokütlesine dönüşünü bildirmişlerdir (25). Domates posasının *Pleurotus ostreatus* ile fermentasyonunda selüloz ve hemiselülözün önemli derecede parçalanmaya maruz kaldığı bildirilmiştir (26). Yukarıda özetlenen çalışmalarda ham selüloz değerlerinin belli oranlarda azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, mevcut çalışmada ham selüloz değerinin yalnızca fermentasyonun

24.saatinde azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak önceki çalışmalarda fermentasyon öncesi yemlere bir mikroorganizma ilavesi olmuşken, bu çalışmada fermentasyon için ayrıca bir maya ilavesi yapılmamıştır.

Hem fermentasyon öncesi hemde fermentasyonun sonrasında gruplar arasında *Saccharomyces cerevisiae* sayıları bakımından önemli bir farklılık görülmemiştir. Fakat 24 ve 48 saatlik bir fermentasyon süresi sonunda yemlerin maya sayılarının fermentasyon öncesine göre önemli düzeyde ($P<0.01$) arttığı tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Fermentasyon öncesi ve sonrası yemlerdeki maya (*Saccharomyces cerevisiae*) sayısı (k.o.b/g).
Table 3. Number of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in feed before and after fermentation (c.f.u / g).

Yemler	0.saat	24. saat	48.saat
A+PS+% 0.5NK	4.35x10 ³	5.94x10 ^{7a}	6.10x10 ⁷
A+PS+% 1NK	4.24x10 ³	5.47x10 ^{7b}	6.19x10 ⁷
A+PS+% 1.5N	4.57x10 ³	5.02x10 ^{7c}	6.23x10 ⁷
A+PS+% 2NK	4.53x10 ³	5.54x10 ^{7b}	6.12x10 ⁷
SEM	0.19	0.126	0.031
P	ÖS	ÖS	ÖS
Fermentasyon Süresi (FS)			
0		4.42 x 10 ^{3B}	
24		5.49 x 10 ^{7A}	
48		6.16 x 10 ^{7A}	
SEM		0.102	
P		0.002	
Nar Kabuğu Seviyesi (NKS)			
% 0.5		4.01 x 10 ⁷	
% 1		3.88 x 10 ⁷	
% 1.5		3.75 x 10 ⁷	
% 2		3.88 x 10 ⁷	
SEM		0.99	
P		ÖS	
FS x NKS		ÖS	

a-b: Bir sütündeki farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır. A-B: Farklı harfler her bir parametreye ait ortalamalarının üç farklı fermentasyon süresinde birbirinden farklı ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir. A:Arpa PS: Peynir altı suyu NK: Nar kabuğu, ÖS: Önemsiz.

Tek hücre protein kaynağı olan maya kültürü, kanatlı rasyonlarında kullanılan önemli bir probiyotik yem katkı maddesidir. Çok iyi protein ve amino asit kaynağı olan mayalar %75 su ve %25 kuru maddeden oluşmaktadır. Maya kuru maddesinin yaklaşık %45-

55'i ham proteinden ibarettir (27). B grubu vitaminleri ve E vitamini bakımından oldukça zengin olan mayalar, fosfor, potasyum, magnezyum, çinko, krom, selenyum, demir ve manganez de içermektedir (17).

Katı faz fermentasyon çalışmalarında genellikle bakteri kültürleri ile *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ve *Saccharomyces cerevisia* gibi fungus kültürleri kullanılmaktadır. Fermentasyona bağlı olarak ortamda oluşan mikroorganizmalar fitaz, proteaz, galaktosidaz, amilaz, lipaz ve selüloz gibi enzimler ile sitrik asit, fumarik asit, laktik asit ve oksalik asit gibi organik asitler üretmektedirler (28). Meydana gelen bu enzimler ortamda bulunan substratın çeşidine göre çeşitli besin maddelerinin parçalanmasına katkı sağlayarak yemlerin yararlılık derecesini önemli düzeyde artırmaktadırlar. Ayrıca yemlerde bulunan birçok antibesinsel faktörün miktarında da azalmalara neden olmaktadır. Peynir altı suyu ve meyve posaları gibi endüstri atıklarının maya üretiminde kullanılması, bu tür atıkların geri kazanılması veya gıdaya dönüştürülmesi açısından oldukça önemlidir (29). Bu çalışmada peynir altı suyu ile fermente edilen arpanın maya sayısında önemli düzeyde artış olduğu gözlenmiştir. Yani bu çalışma ile arpaya probiyotik özellik kazandırılmıştır.

Tablo 4. incelendiğinde yemlere nar kabuğu ilavesinin 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) değerini artırdığı gözlemlenmiştir. Tüm yemlerde en yüksek DPPH değeri A+PS+% 1.5 NK ve A+PS+% 2NK gruplarında görülmüştür. Fermentasyon süresinin DPPH üzerine etkisi incelendiğinde, süreye bağlı olarak antioksidan aktivitenin arttığı tespit edilmiş olup en yüksek aktivite 48.saatte görülmüştür. Nar kabuk seviyesinin artışına bağlı olarak antioksidan aktivitenin de arttığı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada fermentasyon öncesi ve sonrası yemlerin DPPH değerleri bakımından önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Buna fermentasyon işleminin neden olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda fermentasyon sonucu yemlerin yapısında bulunan serbest fenolik bileşiklerin oransal

olarak arttığı ve buna bağlı olarak antioksidan aktivitenin yükseldiği bildirilmiştir (30,31). Mevcut araştırmaya benzer olarak ekmek ununa farklı seviyelerde ilave edilen nar kabuğunun DPPH değerini oransal olarak artırdığı bildirilmiştir (32). Cingöz ve ark. (33), ince ve kalın buğday kepeği örneklerinde yaptıkları analizlerde kepekteki fenolik madde miktarının artışına bağlı olarak antioksidan kapasitesinin de arttığını bildirmişlerdir.

Tablo 4. Fermentasyon öncesi ve sonrası yemlerin antioksidan aktivitesi (%DPPH).

Table 4. Antioxidant activity of feed before and after fermentation (DPPH %).

Yemler	0.saat	24. saat DPPH (%)	48.saat DPPH (%)
A+PS+% 0.5NK	55.67 ^b	58.64 ^b	62.34 ^b
A+PS+% 1NK	57.56 ^b	58.98 ^b	61.99 ^b
A+PS+% 1.5N	60.39 ^a	61.18 ^a	63.76 ^a
A+PS+% 2NK	60.98 ^a	62.87 ^a	65.17 ^a
SEM	1.45	2.09	1.97
P	0.034	0.028	0.011
Fermentasyon Süresi (FS)			
0.saat		58.65 ^c	
24.saat		60.42 ^b	
48.saat		63.32 ^a	
SEM		2.54	
P		0.038	
Nar Kabuğu Seviyesi (NKS)			
% 0.5		58.88 ^b	
% 1		59.51 ^b	
% 1.5		61.78 ^a	
% 2		63.00 ^a	
SEM		2.07	
P		0.043	
FS x NKS		ÖS	

a-b: Bir sütündeki farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05). A-B: Farklı harfler her bir parametreye ait ortalamalarının üç farklı fermentasyon süresinde birbirinden farklı (P<0.05) olduğunu göstermektedir. **:P<0.01 A:Arpa PS: Peyniraltı suyu NK: Nar kabuğu, ÖS: Önemsiz.

Cingöz ve ark. (33), ince ve kalın buğday kepeği örneklerinde yaptıkları analizlerde kepekteki fenolik madde miktarının artışına bağlı olarak antioksidan kapasitesinin de arttığını bildirmişlerdir. Rashad ve ark. (18), farklı maya suşları ile fermente ettikleri okora adlı soya yan ürününün antioksidan aktivitesinin fermente olmayana göre oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bazı

araştırmacılar fermente edilmiş okorada, fermente edilmemiş okaraya göre daha fazla antioksidan bileşenlerinin mevcut olduğunu, bunun da DPPH radikalleri ile hızla reaksiyona girebildiğini ve mevcut tüm hidroksil gruplarına karşılık DPPH radikal moleküllerini azaltabildiğini ileri sürmüşlerdir (34). Moore ve ark. (23), farklı mayalar ile fermente ettikleri buğday kepeğinin antioksidan aktivitesinin önemli düzeyde yükseldiğini rapor etmişlerdir.

Tosun (35), 72 saat süreyle *A. niger* ile fermentasyona tabi tuttuğu elma ve domates posalarında antioksidan seviyesinin önemli derecede arttığını tespit etmiştir. Benzer olarak, Baran (15), bazı bakteriler ile fermentasyona tabi tuttuğu arpa ve yulafın fenolik içeriğinin %70-300 oranında arttığını ve buna bağlı olarak yemlerin antioksidan değerinde %59-92 oranında bir artış olduğunu rapor etmiştir. Moore ve ark. (36) buğday kepeğine maya ilave ederek katı faz fermentasyonu uygulamasının antioksidan değeri önemli ölçüde değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Denemelerden elde edilen sonuçlara göre arpaya nar kabuğu ilave edilerek peyniraltı suyu ile fermentasyona tabi tutulması ile besin madde kompozisyonunun iyileştiği, probiyotik olan maya sayısının arttığı ve antioksidan özellik kazandığı tespit edilmiştir. En yüksek maya sayısı ve antioksidan aktivite fermentasyonun 48.saatinde elde edilmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Yaşar S., 1998. Assessment of the nutritional effects of water treatment of feed for poultry, (Doktora tezi), Leeds University. Department of Animal Physiology & Nutrition. School of Biology, UK.
2. Yaşar S., Gök MS., 2014. Fattening performance of Japanese Quails (*coturnix coturnix japonica*) fed on diets with high levels of dry fermented wheat, barley and oats grains in whey with citrus pomace. Bull Univ Agric Sci Vet Med. 71, 51-62.
3. Zhang W., Xu Z., Sun J., Yang X., 2006. A study on

- the reduction of gossypol levels by mixed culture solid substrate fermentation of cottonseed Meal. *Asian-Australian J Anim Sci.* 19, 1314-1321.
4. Kim YG., Lohakare JD., Yun JH., Heo S., Chae BJ., 2007. Effect of feeding levels of microbial fermented soy protein on the growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology in weaned piglets. *Asian-Australian J Anim Sci*, 20, 399-404.
 5. Oduguwa OO., Edema MO., Ayeni AO., 2007. Physicochemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. *Bioresource Tech*, 99, 1816-1820.
 6. Krishna CH., 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Rev Biotech*, 25, 1-30.
 7. Araya MM., Arrieta JJ., Perez-Correa JR., Biegler LT., Jorquera H., 2007. Fast and reliable calibration of solid substrate fermentation kinetic models using advanced non-linear programming techniques. *Electronic J Biotech*, 10, 1.
 8. Gil MI., Tomas-Barberan FA., Hess-Pierce B., Holcroft DM., Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 48, 4581-4589.
 9. Seeram NP., Adams LS., Henning SM., Niu Y., Zhang Y., Nair MG., Heber D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutrition Biochem*, 16, 360-367.
 10. Güzeler N., Esmek EM., Kalendar M., 2017. Peyniraltı suyu ve peyniraltı suyunun içecek sektöründe değerlendirilme olanakları. *Çukurova Tarım Gıda Bil Derg*, 32, 27-36.
 11. Kutlu HR., 2008. Yem değerlendirme ve analiz yöntemleri. yem değerlendirme ve analiz yöntemleri. Ç Ü Ziraat Fak Zootečni Bölümü, Ders Notu, Adana.
 12. Blois MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
 13. Halkman K., 2007. Gıdaların mikrobiyolojik analizi. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 5, 2-6.
 14. Düzgüneş O., Kesici T., Gürbüz F., 1983. Statistical methods I. Ankara Universty, Agriculture Faculty No: 861, p: 229.
 15. Baran B., 2017. Arpa, yulaf ve buğdayın *Lactobacillus salivarius* kullanılarak katı faz fermentasyon ile besin madde bileşiminin zenginleştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
 16. Yaşar S., 2014. Etlik civciv ve piliçlerde buğday, arpa ve yulaf dane yemlerinin peynir suyu ve narenciye posası ile fermentasyona uğratılarak besleme değerlerinin artırılmasına yönelik çalışmalar. TÜBİTAK Proje Raporu. Proje Kodu: 1002, Proje No: 113O201
 17. Pamir MH., 1985. Fermentasyon mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no 936, ss 267, Ankara.
 18. Rashad MM., Mahmoud AE., Abdou HM., Nooman MU., 2011. Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. *Afr J Biotech*, 10, 5504-5513.
 19. Shi C., Zhang Y., Lu Z., Wang Y., 2017. Solid-state fermentation of corn- soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* for degrading antinutritional factors and enhancing nutritional value. *J Anim Sci Biotech*, 8, 50
 20. Hassaan MS., Soltan MA., Abdel-Moez AM., 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Anim Feed SciTech*, 201, 89-98.
 21. Iluyemi FB., Hanafi MM., Radziah O., Kamarudin MS., 2006. Fungal solid state culture of palm kernel cake. *Bioresource Tech*, 97, 477-482.

22. Lateef A., Olok JK., Gueguim Kana EB., Oyeniyi SO., Onifade OR., Oyeleye AO., Oladosu OC., Oyelami AO., 2008. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: Enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World J Microbial Biotech*, 24, 2369-2374.
23. Moore J., Cheng Z., Hao J., Guo G., Guo-Liu J., Lin C., Yu L., 2007. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. *J Agric Food Chem*, 55, 10173-10182.
24. Mathot P., Debevere C., Walhain P., Baudart E., Thewis A., Brakel J., 1992. Composition and nutritive value for rats of *Aspergillus niger* solid fermented barley. *Anim Feed Sci Tech*, 39, 227-237.
25. Shojaosadati S., Faraidouni A., Madadi-Nouei R., Mohamadpour A., 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Res Conservation Rec*, 27, 73-87.
26. Assi JA., King AJ., 2008. Manganese amendment and *Pleurotus ostreatus* treatment to convert tomato pomace for inclusion in poultry feed. *Poultry Sci*, 87, 1889-1896.
27. Tangüler H., Erten H., 2006. Otoliz yolu ile maya ekstraktı üretimi. *Gıda Yem Bil Tek*, 9, 55-62.
28. Pandey A., Soccol CR., Mitchell D., 2000. New developments in solid state fermentation: ı-bioprocesses and products. *Process Biocem*, 35, 1153-1169.
29. Ukaegbu-Obi KM., 2016. Single cell protein: a resort to global protein challenge and waste management. *J Microbiol Microbial Tech*, 1, 5.
30. Martins S., Mussatto SI., Martinez-Avila G., Montanez-Saenz J., Aguilar CN., Teixeira JA., 2011. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation: A review. *Biotech Adv*, 29, 365-373.
31. Tapati BD., Kuhad RC., 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotech Reports*, 4, 120-127.
32. Yılmaz M., 2011. Türkiye’de yetiştirilen başlıca buğday çeşitlerinin antioksidan aktivitelerinin ve fenolik asit dağılımlarının belirlenmesi ve ekmeğin nar kabuğu ekstraktı ile zenginleştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara.
33. Cingöz A., Akpınar Ö., Sayaslan A., 2017. Farklı kepek fraksiyonlarının fonksiyonel özellikleri ve hamur reolojik özelliklerine etkisi. *Gaziosmanpaşa Üniv Ziraat Fak Derg*, 34, 128-138.
34. Brand-Williams W., Cavalier ME., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*, 28, 25-30.
35. Tosun R., 2017. Fungal mikroorganizmalar ile katı-faz fermentasyonuna tabi tutulan elma ve domates posasının besin madde bileşiminin kanatlı hayvanlar için yararlı hale getirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
36. Moore J., Cheng Z., Hao J., Guo G., 2019. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. *J Agric Food Chem*, 55, 10173-10182.



Kars Yöresinde Kazlarda *Salmonella* Enteritidis Antikorlarının ELISA ile Araştırılması*

Murat Alper ÜRE^{1a}, Fatih BÜYÜK^{2b}✉

1. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, TÜRKİYE.

2. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.

ORCID: 0000-0002-4021-0390^a, 0000-0003-3278-4834^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
23.07.2019	03.12.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Üre MA, Büyük F: Kars Yöresinde Kazlarda *Salmonella* Enteritidis Antikorlarının ELISA ile Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 324-329, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.595567.

Öz: Bu çalışmada, Kars yöresinde halk elinde yetiştirilen kaz işletmelerinden kaz kesimi esnasında alınan kan serum örneklerinde *Salmonella* Enteritidis antikorlarının Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönetimi ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Kars il merkezinde 8 ve Arpalı köyünde 2 kaz işletmesinden olmak üzere toplam 10 farklı işletmeden ve önceden *S. Enteritidis* ve diğer *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı herhangi bir aşı geçmişi olmayan 1 yaşındaki 315 adet erkek ve dişi yerli kazdan örnek alındı. İncelenen 315 kaz kan serum örneğinin 16 (%5.07)'sı *S. Enteritidis* antikorları yönünden pozitif, 48 (%15.23)'i şüpheli ve 251 (%79.68)'i negatif saptandı. En yüksek *S. Enteritidis* antikor pozitifliği Kars il merkezindeki işletme 7 ile Arpalı köyündeki işletme 10'da (sırasıyla %16.66 ve %12.5) saptandı ve işletmeler arası bu pozitiflik istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.01$) bulundu. Kars ile merkezine (%4.16) oranla Arpalı köyü işletmelerine ait *S. Enteritidis* antikor pozitifliği (%8) daha yüksek saptanırken, bu iki lokasyona ait işletmeler arası anlamlı fark belirlenmemiştir ($P>0.05$). Kars yöresinde kazlarda *S. Enteritidis*'in varlığı ve yaygınlığı üzerine yapılan bu çalışmada, kaz kan serumu örneklerinden %5.07 oranında antikor pozitiflik saptanmasının önemli olduğu; bununla birlikte vertikal bulaşma özelliğine sahip olan ve karkas kontaminasyonunun yaygın olduğu *Salmonella* enfeksiyonlarında benzer tarama testleri yapılmasının hastalığın prevalansının azaltılmasına fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Kan, Kaz, *Salmonella* Enteritidis.

Investigation of *Salmonella* Enteritidis Antibodies in Geese in Kars Province by ELISA

Abstract: In this study, it was aimed to investigate *Salmonella* Enteritidis antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in blood serum samples obtained from the goose enterprises grown in Kars Region during the goose slaughtering period. For this purpose, a total of 10 different flocks, 8 from Kars Province center and 2 from Arpalı Village, were included in the study. Totally, one year old 315 female and male domestic geese which had no vaccination history against *S. Enteritidis* and other *Salmonella* infections were sampled. Of the 315 goose blood serum samples examined, 16 (5.07%) were positive, 48 (15.23%) were suspicious and 251 (79.68%) were negative for *S. Enteritidis* antibodies. The highest *S. Enteritidis* antibody positivity was detected in the Flock 7 in Kars city center and in the Flock 10 in Arpalı Village with a rate as 16.66% and 12.5%, respectively. This positivity between the flocks was statistically significant ($P<0.01$). While the *S. Enteritidis* antibody positivity (8%) of Arpalı Village was found higher than the Kars Province central has (4.16%), there was no significant difference between these two locations ($P>0.05$). In this study conducted on the presence and prevalence of *S. enteritidis* in geese in Kars province, it was found that 5.07% antibody positivity was considered to be important in geese blood serum samples; in addition to this, similar screening tests for *Salmonella* infections, which have vertical transmission characteristic and carcass contamination are common, are thought to be beneficial in decreasing the prevalence of the disease.

Keywords: Blood, ELISA, Goose, *Salmonella* Enteritidis.

✉ Fatih Büyük

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.

e-posta: fatihbyk08@gmail.com

* Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü aynı adlı Yüksek Lisans tez çalışmasından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Doğada yaygın olarak bulunan *Salmonella*'lar, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olup yaptığı hastalıklar genel olarak "Salmonellozis" olarak adlandırılır. *Salmonella* türleri konak hücrenin hemen hemen her türüne adapte olabilir, bu yönleriyle evrensel patojenler olarak adlandırılır ve önemli zoonotik hastalıklara yol açarlar. *Salmonella*'lar kanatlı hayvanlarda başta gastrointestinal sistem olmak üzere birçok sistemi etkileyen çeşitli enfeksiyonlara yol açarlar (1).

Salmonella'lar insanlarda kanatlı kökenli gıda toksikasyonlarının da önemli kaynaklarıdır. *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Newport ve daha birçok *Salmonella* türünün neden olduğu Paratifo enfeksiyonları bunlardan birisidir. Paratifo enfeksiyonları kazlarda açık klinik belirtilere yol açmadan insanlara kontamine yumurta ve et ile bulaşabilmektedir (2,3). Klinik belirtilerin daha çok 6 haftalıktan küçük kazlarda görüldüğü Paratifo Hastalığının kesin teşhisi etken izolasyonu ve identifikasyonu ile yapılmaktadır. Bu tekniklerin yanı sıra özellikle kontrol programlarında serolojik teknikler kullanılmakta ve bu tekniklerden sadece enfeksiyon prevelansının azaltılmasına yönelik değil aynı zamanda gıda kontaminasyonunu önlenmesi ve bununla ilgili rutinleri değiştirmek için de faydalanılmaktadır. Tarama testi olarak etken spesifik şekillenen antikorların saptanmasında otomatize edilmiş ELISA yöntemleri yaygın kullanılmaktadır (4-6).

Yetiştirilmesi ve bakımı tavuk ve hindi gibi diğer kümes hayvanlarına göre daha kolay ve masrafsız olan fakat üreme yeteneği ve dölverimi daha düşük olan kaz yetiştiriciliği dünyanın birçok ülkesinde ve ülkemizde kanatlı hayvan sektörü içerisinde son sıralardadır. Oysaki, düşük yağ ve kolesterol içeriği ve yüksek besleyici değeri ile kaz eti; lüks lokantalarda kıymetli bir yemeği olan kaz ciğeri; hijyenik, yıkanabilir ve terletmeyen bir tekstil dolgu maddesi olan kaz tüyü ve kümes hayvanları arasında en ağır

kitleye sahip kaz yumurtası kazcılık sektörünün önemli ürünleridir. Fransa başta olmak üzere Polonya, Macaristan, İsrail, Rusya, İngiltere, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Çekya ve Bulgaristan gibi ülkelerde kaz yetiştiriciliği farklı sektörel yönleriyle yapılmaktadır. Su kaynakları bakımından zengin olan ülkemiz diğer kümes hayvanlarına göre daha sucul olan kaz yetiştiriciliği açısından son derece elverişlidir. Fakat kaz yetiştiriciliği özellikle Kars, Erzurum, Ağrı ve Van gibi illerde yayılım göstermekte ve genellikle yerel halkın kışlık et ve yemeklik yağ ihtiyacını karşılayan bir gıda maddesi olarak tüketilmektedir (7,8).

İnsan sağlığını korumak için yapılan programlarda özellikle hayvansal üretim aşamasında *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrol edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla damızlık sürülerde hastalığın periyodik olarak izlenmesi, kanatlı ürünlerinde *Salmonella* etkenlerinin belirlenmesi, tiplendirilmesi ve biyogüvenlik uygulamalarının eksiksiz yerine getirilmesi hedeflenmektedir. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada Kars yöresinde halk elinde yetiştirilen kaz işletmelerinden kaz kesim döneminde alınan kan serum örneklerinde *Salmonella* Enteritidis antikorlarının ELISA yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada, 2016-2017 yılları arasında Kars il merkezinde bulunan 8 işletme (işletme 1- 8) ile Arpalı köyünde bulunan 2 işletme (işletme 9 ve10) olmak üzere toplam 10 farklı kaz işletmesinde yetiştiriciliği yapılan ve önceden *S. enteritidis* ve diğer *Salmonella* türlerine karşı herhangi bir aşı geçmişi olmayan 1 yaşındaki 315 adet dişi ve erkek yerli kaz kullanıldı. Çalışmada kullanılan hayvanlar üzerindeki uygulamalarda hayvan refahı ve etik kurallara uygun hareket edildi. Kazlardan kesim esnasında boyundan akan kan, steril ve antikoagülsüz tüplere alınarak

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirildi. Kan örnekleri 3000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra çıkarılan serum örnekleri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve etiketlenerek analiz edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Metot

ELISA Yöntemi

Bu çalışmada kaz kan serum örneklerinde *S. Enteritidis* antikorlarının araştırılması amacıyla ticari ELISA kiti (*Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kiti, Idexx, USA) kullanıldı. Test üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Örnekler için adsorbans değerler 650 nm (A(650)) spektrofotometrede ölçüldü. Örnek optik dansite (OD) değerleri Excel dosyasına yüklendikten sonra sonuçların analizi xChekPlus* (Idexx) yazılımı programı aracılığı ile gerçekleştirildi. Serum örneklerinde *S. Enteritidis* spesifik antikorlarının varlığı veya yokluğu ise herbir örnek için ayrı ayrı hesaplanan "Örneğin, Negatif Kontrole oranı (S/N)" formülü ile saptandı. S/N değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüllerden faydalanıldı.

Negatif Kontrol ortalaması

$$(NK\bar{x}) = \frac{NK1 A(650) + NK2 A(650)}{2}$$

Pozitif Kontrol ortalaması

$$PK(\bar{x}) = \frac{PK1 A(650) + PK2 A(650)}{2}$$

$$S/N Oranı = \frac{\text{Örnek } A(650)}{NK\bar{x}}$$

S/N oranları " $S/N \leq 0.599$ " olan örnekler "POZİTİF", " $0.750 \geq S/N \geq 0.600$ " olan örnekler "ŞÜPHELİ" ve " $S/N \geq 0.751$ " olan örnekler "NEGATİF" olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Veri analizi IBM SPSS Statistic 20.0. program dahilinde yapıldı (SPSS 2011). İşletme içi ve işletmeler arası pozitiflik değerlerinin karşılaştırılması Ki-kare testi ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

ELISA Bulguları

Bu çalışmada Kars il merkezinde bulunan 8 işletmeden alınan toplam 240 kaz serumundan 10 (%4.16)'unda *S. Enteritidis* antikoruna saptanırken, örneklerin 38 (%15.83)'ü şüpheli ve 192 (%80)'si negatif bulunmuştur. En yüksek (%16.66) pozitiflik işletme 7'de elde edilmiştir (Tablo 1). Merkezden örneklenen işletmeler arası *S. Enteritidis* pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($P < 0.01$).

Tablo 1. Örnek bilgileri ve ELISA test sonuçlarına ait sayısal veriler.

Table 1. Sample information and numerical data of ELISA test results.

Örnek bilgileri			Pozitif		Şüpheli		Negatif	
Odak	İşletme kodu	Örnek sayısı	n	%	n	%	n	%
Merkez	1	30	0	0	2	6.66	28	93.33
	2	30	1	3.33	3	10	26	86.66
	3	30	0	0	1	3.33	29	96.66
	4	30	1	3.33	3	10	26	86.66
	5	30	1	3.33	13	43.33	16	53.33
	6	30	0	0	8	26.66	22	73.33
	7	30	5	16.66	1	3.33	24	80
	8	30	2	6.66	7	23.33	21	70
Arpalı	9	35	1	2.85	6	17.14	28	80
	10	40	5	12.5	4	10	31	77.5
Toplam		315	16	5.07	48	15.23	251	79.68

Çalışmada, Arpalı köyünde bulunan 2 işletmeden alınan toplam 75 kaz serumunun 6 (%8)'sı *S. Enteritidis* antikorunu yönünden pozitif, 10 (%13.33)'u şüpheli ve 59 (%78.66)'u negatif olarak belirlenmiştir. En yüksek (%12.5) pozitiflik işletme 10'da elde edilmiştir (Tablo 1). Arpalı köyünde bulunan işletmeler arası *S. Enteritidis* pozitifliği istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$).

Çalışmada, Kars il merkezi ve Arpalı köyünde bulunan 10 işletmeden toplamda 315 kaz kan serumu ELISA ile incelenmiş ve bu örneklerin 16 (%5.07)'sı *S. Enteritidis* antikorları yönünden pozitif saptanmıştır. Örneklerin 48 (%15.23)'i spesifik antikorlar bakımından şüpheli iken, 251 (%79.68) örnek ise negatif bulunmuştur. Arpalı köyüne ait işletmelerdeki *S. Enteritidis* pozitifliği (%8), Kars il merkezinde bulunan işletmelere (%4.16) göre daha yüksek saptanmıştır. Tüm işletmeler dikkate alındığında en yüksek *S. Enteritidis* antikor pozitifliği Kars il merkezine ait işletme 7 ve Arpalı köyünde bulunan işletme 10'da (sırasıyla %16.66 ve %12.5) saptanmıştır (Tablo 1). Çalışmadaki tüm işletmeler arası *S. Enteritidis* pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.01$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Paratifo, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* gibi konakçı spesifik olmayan türler tarafından oluşturulan ve kanatlılarda genel durum bozukluğu, ishal ve gelişme geriliği gibi spesifik olmayan belirtilerle ortaya çıkan enfeksiyöz bir hastalıktır. Kanatlı hayvanlar *Salmonella* bakterileri asemptomatik olarak da taşıyabilmektedirler (2,3). *Salmonella* etkenleri kanatlı eti ve yumurtalarının aracılık ettiği gıda kaynaklı insan enfeksiyonlarından sorumlu en önemli bakteri türleridir. Türkiye'deki çalışmalarda et numunelerinde *Salmonella* prevalansı %18 civarında iken (9,10), bu oran Çin'de yapılan bir çalışmada (11) %14.98 olarak saptanmış ve tüm bu çalışmalarda *S. Enteritidis* predominant serotip olarak bildirilmiştir.

Salmonella enfeksiyonlarının teşhisinde bakterinin dışkı, bağırsak içeriği, karkas ve iç organlar

gibi çeşitli örneklerden izolasyon ve identifikasyonuna yönelik birçok çalışma (12-14) mevcut olup bakteriyolojik metotlar genellikle hem ulusal hem de Avrupa Birliği seviyesindeki mevzuatlarla zorunlu kılınmıştır. Jamali ve ark. (14) tarafından İran'da yapılan bir çalışmada 180 kaz bağırsak içeriğinin %12.8'inde *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Benzer bir çalışma Pan ve ark. (13) tarafından yapılmış ve incelenen 505 kaz fekal örneğinden %10.7 pozitiflik elde edilmiştir. Kars yöresinde yapılan bir çalışmada 385 kaz, 30 güvercin, 20 ördek, 20 tavuk ve 42 hindiye ait toplam 497 kloakal svap örneği ve 21 tavuk, 59 karga, 27 serçe ve 60 martıya ait toplam 167 fekal örnek incelenmiş ve sadece 6 (%1.55) kazdan *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirilmiştir (12). Teşhiste konvansiyonel metotlara alternatif olarak kısa sürede ve daha güvenilir sonuçlar veren moleküler tekniklerden de faydalanılmıştır (15,16). *Salmonella* türleri ile enfekte olmuş kanatlı sürülerinde hastalık prevalansı hakkında doğru veriler üretmek kamusal bir ilgi ve gereklilik uyandırmıştır. Bu bağlamda insan enfeksiyonlarında predominant bir tür olan *S. Enteritidis* kanatlılarda artan sayıda bildirilmeye başlanmıştır (12,14,17-19). Aksakal ve ark. (18) tarafından Van yöresinde yapılan bir çalışmada tavuk, hindi, bıldırcın ve devekuşu dışkılarında *Salmonella* türleri araştırılmış, dışkı örneklerinden %4.08 oranında *Salmonella* spp. identifiye edilmiş ve tavuk ve hindi dışkı örneklerinden izole edilen primer tür *S. Enteritidis* olarak bildirilmiştir. Jamali ve ark. (14), İran'da inceledikleri 180 kaz bağırsak içeriğinden %12.8 *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirmiş ve bunların %8.7'sini *S. Enteritidis* olarak tanımlanmışlardır. Trawinska ve ark. (19) tarafından Polonya'da yapılan bir çalışmada kazlarda %42.8'lik oranında *S. Enteritidis* saptanmıştır.

Etkenin aralıklı saçılması özellikle dışkı ve bağırsak materyallerinde bakteriyolojik identifikasyon şansını azaltmaktadır. Ayrıca kontamine bu tür materyallerden etkenin seleksiyonu zor ve zahmetlidir. Bu nedenlerle birçok araştırmacı tarafından kanatlı işletmelerinde *S.*

Enteritidis enfeksiyonlarını saptamak için serolojik tekniklerin kullanılabilirliklerinden bahsedilmiştir (5,6,20). Cooper ve ark. (21), yumurtacı ve damızlık 3 kanatlı kümesinden aldığı 25 örneğin tümünde *S. Enteritidis* lipopolisakkarit (LPS) spesifik yüksek antikör titresi saptamışlardır. Chart ve ark. (22), incelediği 29 yumurtacı tavuktan 10 (%34.48)'unda *S. Enteritidis* pozitifliği elde etmiştir. De Jong (23), tarafından yapılan bir çalışmada LPS temelli indirek ve çift antikör sandviç ELISA yöntemini karşılaştırılmış, 1148 serum örneği sandviç ELISA negatif saptanırken indirek ELISA ile örneklerin 1038'i negatif ve 110'u *Salmonella* pozitif saptanmıştır. Tavuklarla yapılan bir çalışmada, analiz edilen 400 örnekten en sık (%84.62) izole edilen serotip *S. Enteritidis* olup *Salmonella* prevalansı ise %13 olarak bildirilmiştir (24). Bu çalışmada Kars yöresinden alınan 315 kaz kan serumu *S. Enteritidis* antikörleri yönünden ELISA ile incelenmiş ve incelenen örneklerin 16 (%5.07)'sı *S. Enteritidis* antikörleri yönünden pozitif saptanmıştır. Farklı mikrobiyolojik yöntemlerle belirlenmiş olmalarına rağmen bu çalışmadaki seropozitiflik oranı kazlarda *Salmonella* spp. ve *S. Enteritidis* oranlarına (13,14,18) oldukça benzerdir. Prevalans oranlarındaki farklılıkların ise çalışmanın yapıldığı coğrafik bölgenin, çalışılan hayvan ırkının ve çalışılan yöntemin farklı olmasından kaynaklanıyor olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu durum polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) kullanıldığı ve daha fazla pozitifliğin elde edildiği (16) moleküler teknikler için de geçerlidir. Bu çalışmadaki prevalans değeri Kars yöresinde Genç ve Otlu (12)'nun kaz ve farklı kümes hayvanını örneklediği çalışmalarında kazlardaki *Salmonella* spp. izolasyon oranlarına (%1.55) oldukça yakındır. İzolasyondaki zorluklar ve serolojik tekniklerde karşılaşılabilecek olası çapraz reaksiyonlar yörede yapılan iki çalışma arasında küçük farklılıklara neden olmakla beraber bu sonuçlar yörede kazlarda %5 civarı *Salmonella* spp. varlığını işaret etmektedir. *S. Enteritidis* prevalans değerinin farklı kanatlı türlerinin kullanıldığı çalışmalarda (19,22) oranlara göre düşük olması ise kazların tavuk ve diğer kanatlılara göre hastalıklara

daha dirençli olmalarından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. *Salmonella* etkenlerine yönelik serolojik çalışmalar genellikle tavuklarla sınırlı kalmış ve prevalans belirlemeden ziyade daha çok farklı antijenik yapıların kullanıldığı ELISA yöntemlerinin geliştirilmesi ve sonuçların karşılaştırılması şeklinde yürütülmüştür (21,22,24,25). Ayrıca kaz yetiştiriciliğinin ülke genelinde çok yaygın olmaması ve dolayısıyla kazlarla ilgili çalışmaların yetersizliği veya olmamasından dolayı Kars Yöresinde kazlarda *S. Enteritidis* seroprevalans değerlerini diğer araştırmalarla sağlıklı bir şekilde karşılaştırma imkanı olmamıştır.

Sonuç olarak, Kars yöresinde kazlarda *S. Enteritidis*'in varlığı ve yaygınlığı üzerine yapılan bu çalışmada, kaz kan serumu örneklerinden %5.07 oranında pozitiflik saptanması önemlidir. *Salmonella* pozitifliği bakımından merkez mahalleler ve Arpalı köyüne ait işletmeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Bu durum yörede ortak olan geleneksel aile tipi yetiştiriciliğin bir yansıması olarak düşünülmektedir. Ayrıca çalışılan lokasyonlarda herhangi bir coğrafik farklılığın olmaması da buna neden olarak gösterilebilir. Serolojik testlerde rastlanabilecek çapraz reaksiyonlar göz önünde bulundurulduğunda ELISA ile saptanan pozitif hayvanların etken saçılımı açısından kültürel yöntemlerle de izlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Rahman HS., Othman HH., 2017. *Salmonella* Infection: The common cause of human food poisoning. *Prog Biosci Bioeng*, 1, 5-10.
2. Brito DAP., Sousa GLA., de Souza YL., Reis V., de Sousa Silva JR., Reis A., Oba A., 2019. Sources of paratyphoid *Salmonella* in the production chain of broilers in the Northern mesoregion of Maranhão State, Brazil. *Vet Med*, 40, 3021-3034.
3. Otlu S., 2016. Kazlarda Enfeksiyöz Hastalıklar. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special*

- Topics, 2, 56-65.
4. Nicholas RAJ., Cullen GA., 1991. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella* Enteritidis in chicken flocks. *Vet Rec*, 128, 74-76.
 5. Furrer B., Baumgartner A., Bommeli W., 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Salmonella* Enteritidis in chicken blood or egg yolk. *Zentralbl Bakteriologie*, 279, 191-200.
 6. Barrow PA., 1994. Use of ELISAs for monitoring *Salmonella* in poultry. *Vet Rec*, 22, 99.
 7. Arslan C., 2013. Kaz Besleme ve Yetiştiriciliği. 2. Baskı, Ss: 1-130, Medipres Matbaacılık Yayıncılık, Malatya.
 8. Tilki M., Saatçı M., 2013. Her Yönüyle Kaz Yetiştiriciliği. 1. Baskı, Ss: 1-131, Salmat Basım Yayıncılık, Ankara.
 9. Carlı T., Caner V., Eyigör A., 2001. Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. *J Food Prot*, 64, 1832-1835.
 10. Goncagul G., Gunaydın E., Carlı KT., 2005. Prevalence of *Salmonella* serogroups in chicken meat. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 103-106.
 11. Cui M., Xie M., Qu Z., Zhao S., Wang J., Wang Y., He T., Wang H., Zuo Z., Wu C., 2016. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. *Food Control*, 62, 270-276.
 12. Genç O., Otlu S., 2005. *Salmonella* isolations from different avian species in Kars district of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 11, 25-27.
 13. Pan ZM., Geng SZ., Zhou YQ., Liu ZY., Fang Q., Liu BB., Jiao XA., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* sp. isolated from domestic animals in Eastern China. *J Anim Vet Adv*, 9, 2290-2294.
 14. Jamali H., Radmehr B., Ismail S., 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese. *Poult Sci J*, 93, 1023-1030.
 15. Ata Z., Temelli S., Eyigör A., Çarlı KT., 2017. *Salmonella* Enteritidis predominance determined by serotyping and real-time PCR in poultry-derived food and avian isolates. *Turk J Vet Anim Sci*, 41, 187-192.
 16. Whyte P., McGill K., Collins JD., Gormley E., 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol*, 89, 53-60.
 17. Rodrigue DC., Tauxe RV., Roe B., 1990. International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? *Epidemiol Infect*, 105, 21-27.
 18. Aksakal A., 2003. Bazı kanatlıların dışkılarında *Salmonella* türlerinin varlığı ve yaygınlığı ile antibiyotik duyarlılıkları. *YYU Vet Fak Derg*, 14, 95-101.
 19. Trawinska B., Saba L., Wdowiak L., Ondrasovicova O., Nowakowicz-Debek B., 2008. Evaluation of *Salmonella* rod incidence in poultry in the Lublin Province over the years 2001-2005. *Ann Agr Env Med*, 15, 131-134.
 20. Ibrahim HM., Sayed RH., Abdel-Aziz WR., Soliman RT., 2017. Preparation and evaluation of *Salmonella* Enteritidis antigen conjugated with nanogold for screening of poultry flocks. *Vet World*, 10, 848-853.
 21. Cooper GL., Nicholas RAJ., Bracewell CD., 1989. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Rec*, 125, 567-572.
 22. Chart H., Rowe B., Baskerville A., Humphrey TJ., 1990. Serological response of chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. *Epidemiol Infect*, 104, 63-71.
 23. De Jong WA., 1993. *Salmonella* Enteritidis eradication programme in The Netherlands. Proceedings of the EC Workshop on ELISAs for serological detection of *Salmonella* in poultry. 7-9 June, Brussels.
 24. Dahal N., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in imported chicken carcasses in Bhutan. Master Thesis, Chiang Mai University And Free University, Berlin.
 25. Mirhosseini SA., Fooladi AAI., Amani F., Sedighian H., 2017. Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella* Enteritidis. *Brazilian J Microbiol*, 48, 774-781.



Anterior Uveitis and Aqueous Lipidose Associated with Hyperlipidemia in Two Cats

Aynur DEMİR^{1 a✉}, Gülşen Sevim KARAGÖZOĞLU^{1b}, Burcu Ezgi EREGAR^{1c}

1. Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, İstanbul, TURKEY.
ORCID: 0000-0002-7856-2789^a, 0000-0002-3945-4101^b, 0000-0002-7624-2685^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
07.01.2019	29.06.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Demir, A, Karagozolu GS, Eregar BE: Anterior Uveitis and Aqueous Lipidose Associated with Hyperlipidemia in Two Cats. Atatürk University J. Vet. Sci., 14(3): 330-334, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.509306.

Abstract: A 9 months old male and a 1-year old female crossbreed cats were presented with history of unilateral sudden onset cloudy eye has been reported in this study. Ophthalmological examination was revealed clear corneal surface, corneal edema did not occurred, homogeneous blurred with white color in the anterior chamber of the eyes in both cases and laboratory findings were revealed hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. According to the ocular and laboratory examination findings after the anamnesis, the patients were diagnosed with hyperlipidemia-related aqueous lipidemia. Topical ophthalmic solution of prednisolone sodium fosfat 1% was applied 2 drops, 5 times in a day and low-fat diet was recommended. Both patients were responded to medical treatment within one week, positively. No complications were encountered during the 2-year follow-up period of the patients.

Keywords: Aqueous lipidemia, Cat, Cloudy eye, Hyperlipidemia.

İki Kedide Hiperlipidemi ile İlişkili Anterior Üveit ve Aköz Lipidozis

Öz: Bu çalışmada, tek gözlerinde ani şekillenen bulanıklık şikayeti ile getirilen 9 aylık erkek ve 1 yaşında dişi melez iki kedi rapor edilmiştir. Yapılan göz muayenesinde her iki gözde homojen dağılmış beyaz renkli bulanıklık ile laboratuvar bulgularında hipertrigliseridemi ve hiperkolestrolemi varlığı belirlendi. Alınan anamnez sonrası yapılan oküler ve laboratuvar muayene bulgularına göre hastalara hiperlipidemi ile ilişkili aköz lipidemi teşhisi koyuldu. Topikal prednizolon sodyum fosfat 1% günde 5 kez 2 damla şeklinde uygulanırken, düşük yağlı diet önerildi. Her iki hastada bir hafta içerisinde medikal tedaviye olumlu yanıt alındı. Hastaların yaklaşık 2 yıllık kontrol süreleri boyunca herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmadı.

Anahtar Kelimeler: Aköz lipidemi, Bulanık göz, Kedi, Hiperlipidemi.

✉ Aynur Demir

Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, İstanbul, TURKEY.
e-mail: aynurdemir_1903@hotmail.com

INTRODUCTION

Aqueous lipidosis is a sporadic ocular disease which has an opaque milk-like appearance (1). This condition refers to high levels of triglyceride and cholesterol in the anterior chamber of one or both eyes due to break down in the blood-aqueous barrier(2,3). The clinical appearance of the whiteness is varied depending on type of lipid molecule, accumulated in the anterior chamber (4). It is relatively common in dogs however very rare in cats (5). Despite all of this, it is unclear whether coexistence of uveitis and hyperlipidemia is incidental. A vasculitis due to hyperlipidemia, and then the disruption of the blood-aqueous barrier, and spontaneously occurring lipid flare is a possible scenario of this condition (6). It has been recently reported that nutrition with lipid-rich foods is effective in this condition. Diagnosis of aqueous lipemia in which confused with hypopyon and neoplastic infiltrate (transient lymphoma), is based on clinical findings (4). Treatment varies depending on the underlying cause of the disease (6). In this case report; two cats, one of them diagnosed diabetes mellitus, with aqueous lipidosis were evaluated and the underlying cause were found high-fat diet.

The goal of this report is to contribute to the increase of awareness in veterinary medicine about ocular complications due to metabolic diseases.

CASE REPORT

Case 1

A 9 month-old, non-sterilized male cat was presented for the sudden onset cloudy appearance in the right eye for 2 days. There was no trauma or infection anamnesis and the cat's diet were consisted of food such as egg yolks and white cheese. On the ocular examination, there was no pain. The structure of the right eye was not enough evaluate because of the diffuse white components in the anterior chamber (Figure 1).



Figure 1. Case 1. Diffuse white opacity in the anterior chamber of the right eye.

Şekil 1. Olgu 1. Sağ gözün ön kamarasında diffüz beyaz opasite.

Schirmer tear tests were 14 and 16 mm/min in the right and left eyes, respectively. Fluorescein test was negative for both eyes. The intraocular pressure was 10 and 17 mm Hg in the right and left eyes, respectively by rebound tonometer. All other physical examination findings were healthy. Complete blood count (CBC) and serum biochemical analysis were performed. Results of the CBC were unremarkable. Blood serum was (+4) a lipemic. Results of the biochemical analysis were revealed hyperglisemia (165mg/dl; range 70-150 mg/dl), ALT (122 U/L; range 28-75 U/L), hypercholesterolemia (300 mg/dl; range 82-218 mg/dl), hypertriglyceridemia (108 mg/dL; range 20-90mg/dL). Additional serologic tests for Feline Infectious Peritonitis (FIP), Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) were performed but all of them were negatif. According to the feeding with high-fat diet, ocular signs and laboratory findings revealed diagnosis of aqueous lipidosis associated with secondary hypercholesterolemia, hyperlipidemia. The first step in treatment was started with a low-fat diet. The cat's right eye was treated with topical 1% prednisolone sodium fosfat and 0.3% ofloxacin 5 times daily and dorzolamide HCl-timolole maleat ophthalmic solution was administered 2 times daily against the secondary glaucoma. The owner reported the right eye has become more transparent within 96 hours. On the

5th day of treatment, white, diffuse opacity was decreased and localized in the ventral region of the eye (Figure 2).



Figure 2. Case 1. Clinical appearance of opacity on the 5th day of treatment.

Şekil 2. Olgu 1. Tedavinin 5. gününde opasitenin klinik görünümü.

The iris shape and structure were observed easily and normal. After 2 weeks of treatment, blood results were decreased to normal values.

Case 2

A 1 year-old, spayed-female cat was presented with history of an acute onset visual deficit and a white-blue appearance in the left eye. She also recently had polyphagia, polydipsia and polyuria. The owner reported that they fed the cat with food such as eggs, fish etc. During the ophthalmic examination, the left pupil was seen partially and moderately. There was a direct and indirect pupillary light response. The size of the both eyes were similar and normal. Schirmer and fluorescein tests were in normal. Intraocular pressures were 18 and 12 mm Hg in the right and left eyes, respectively. In the left eye, uveitis was diagnosed. Fundus of the right eye was normal, the left one was not evaluated due to the diffuse white opacity (Figure 3).



Figure 3. Case 2. Appearance of the anterior segment of the left eye.

Şekil 3. Olgu 2. Sol göz ön segmentinin görünümü.

CBC was normal and results of the biochemical analysis revealed were a hyperglisemia (625 mg/dl; range 70-150 mg/dl), uremia (82 mg/dl; range 15-34 mg/dl), AST (71 U/L; range 5-55 U/L), ALT (151 U/L; range 28-75 U/L), ALP (74 U/L; range 0-62 U/L), cholesterol (217 mg/dl; range 82-218 mg/dl), hypertriglyceridemia (354 mg/dl; range 20-90 mg/dl). Glucose was also found in urine. It was assessed in terms of diabetes due to the high level of fasting blood glucose and glucose in the urine. Treatment was started with a low-fat diet. Systemic medical management of diabetes treatment was performed in Department of Internal Medicine Clinic. The same drugs achieved topical treatment of the left eye as the first case. 72 hours after the treatment, it was observed that the cloudy appearance was completely disappeared (Figure 4).

Figure 4. Case 2. The left eye appearance on the 3rd day of the treatment.

Şekil 4. Olgu 2. Tedavinin 3. gününde sol gözün görünümü.



The anterior segment was clearly visible. There was no anomalies in pupil or iris shape and size. No problems were encountered in the follow-up period of 2 years.

DISCUSSION and CONCLUSION

Hyperlipidemia is a carbohydrate and lipid metabolism disease which is defined as increased blood glucose, cholesterol and/or triglyceride concentrations (1,7,8). It is very rare in cats compared to dogs (5,9). This disease is classified into as primary and secondary hyperlipidemia (1,5,8,9). Primary hyperlipidemia is not commonly observed in cat (5). It has been reported to be as a familial disease in Burmese, Himalayan and mixed breed cats. Secondary hyperlipidemia has been reported developing due to the drugs use such as megestrol acetate (cats), obesity (dog), high fat diets, hypothyroidism, hyperadrenocorticism, hyperglycemia, pancreatitis, nephropathy (3,5,9,10). Increased triglycerid levels in the blood can cause lipid accumulation in vascular system, musculoskeletal system and eyes. Increased triglycerides can also cause lesions in the eye such as anterior uveitis, lipid keratopathy and lipemia, chorioretinit, xanthomas (3,10,11). In our cases the only significant ocular clinical finding was the aqueous lipidosis with anterior uveitis. Aqueous lipidosis is the deposition of lipid molecules (cholesterol or triglyceride) in the anterior chamber due to break down of the blood-aqueous barrier and this condition causes a sudden onset of diffuse white opacity of aqueous humor (2,3,10). Arıcan et al. (2018) and Ghaffari(2008) reported that their lesions developed bilaterally in their cases, whereas in this study, the lesions were unilateral in both cases.

The diagnosis of aqueous lipidosis is based on ocular examination findings demonstrating blue-gray appearance in the anterior chamber. Additional, laboratory test results such as elevated serum cholesterol and/or triglyceride levels are supportive for the clinical diagnosis (2).

Treatment of hyperlipidemia involves the management of any underlying systemic disease and

nutritional therapy (2,3,7,9). The underlying causes of hyperlipidemia in these cases were considered as feeding with high-fat-diet and hyperglycemia. In the literature, medical treatment is recommended for the treatment of the disease (9). In most cases, lesions have been reported to be resolved within a few days (1). In our cases, it was determined that medical treatment and low-fat diet was improved hyperlipidemia (case 1: 76 mg/dL, 92 mg/dL), hypercholesterolemia (case 1: 156 mg/dL) and anterior chamber lipemia.

In conclusion; In this study, it is goal to know that anterior uveitis in cats is not only infectious but also due to various nutritional and metabolic diseases and due to its clinical appearance, it can be easily distinguished from other conditions that cause of anterior uveitis.

REFERENCES

1. Hardman C., Stanley RG., 1998. Blue eye in a cat. *Aust Vet J*, 76, 595-596.
2. Esson, DW., 2015. Diseases of the Uvea. *Clinical atlas of canine and feline ophthalmic disease*. John Wiley & Sons. 196
3. Arıcan M., Parlak K., Uzunlu EO., 2018. Lipid-laden aqueous humor in a cat. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24, 901-911.
4. Urbano FL., 2001. Ocular signs of hyperlipidemia. *Hospital Physician*, 37, 51-53.
5. Ghaffari MS. 2008. Iatrogenic hyperlipidemia associated with lipid-laden aqueous humor in a cat following administration of megestrol acetate. *Turk J Vet Anim Sci*, 32, 399-401.
6. Christine W., Simon P., 2014. The uveal tract. In: D Gould, GJ McLellan, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology*. 3th ed., BSAVA, England.
7. Mosallanejad B., Avizeh R., Jalali MR., Pourmahdi M., 2016. Comparative evaluation between chitosan and atorvastatin on serum lipid profile changes in hyperlipidemic cats. *IJVR*, 17, 36.
8. Mori N., Lee P., Muranaka S., Sagara F.,

- Takemitsu H., Nishiyama Y., Arai T. 2010. Predisposition for primary hyperlipidemia in Miniature Schnauzers and Shetland sheepdogs as compared to other canine breeds. *Res Vet Sci*, 88, 394-399.
9. Xenoulis PG., Steiner JM., 2010. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *The Vet J*, 183, 12-21.
 10. Plummer C., Specht A., Gelatt K., 2007. Ocular manifestations of endocrine disease. *Compend Contin Educ Vet*, 29, 12.
 11. Kluger EK., Caslake M., Baral RM., Malik R., Govendir M., 2010. Preliminary post-prandial studies of Burmese cats with elevated triglyceride concentrations and/or presumed lipid aqueous. *JFMS*, 12, 621-630.



Application of Xanten and Its Derivatives in Human and Veterinary Medicine

Alisa SMAJOVIĆ^{1a}, Muhamed KATICA^{2b}, Davorka ZAVRŠNIK^{3c}, Elma VELJOVIĆ^{3d}✉, Kenan
ČAKLOVICA^{4e}

1. University of Sarajevo, Faculty of pharmacy, Department of pharmaceutical informatics and pharmacoconomics, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.
2. University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Pathological Physiology, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.
3. University of Sarajevo, Faculty of pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.
4. University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of meat hygiene and meat products, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.
ORCID: 0000-0002-2497-6744^a, 0000-0002-8184-0065^b, 0000-0001-6486-6813^c, 0000-0003-1129-1491^d, 0000-0001-7506-5843^e

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
20.05.2019	23.09.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Smajović A, Katica M, Završnik D, Veljović E, Čaklovica K: Application of Xanten and Its Derivatives in Human and Veterinary Medicine. *Atatürk University J. Vet. Sci.*,14(3): 335-342, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.567915.

Abstract: Xanthen derivatives represent cyclic, organic compounds that can be natural, semi-synthetic and synthetic origin. These compounds become very interesting because of various pharmacological activities such as antibacterial, antiviral and anti-inflammatory properties. Furthermore, they have been utilized as antagonists for drug-resistant leukemia lines and in photodynamic therapy. They are also applied as dyes in laser technology and pH sensitive fluorescent materials for visualization of biomolecules. Because of new diseases in veterinary medicine, application of these compounds can be very useful and literature describes activity of similar compounds in veterinary research field. In this review the most important activity of xanthen derivatives such as antibacterial, antifungal, antihelminthic, antiprotozoal, anticancerogenic and antidiabetic activity and mechanism of their action are presented.

Keywords: Xanthen derivatives, Pharmacology activities, Veterinary medicine.

Xanten ve Türevlerinin İnsan ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı

Öz: Ksanten türevleri, doğal, yarı sentetik ve sentetik kökenli olabilen siklik, organik bileşikler temsil eder. Bu bileşikler, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamatuar özellikler gibi çeşitli farmakolojik aktiviteler nedeniyle dikkat çekmektedirler. Ayrıca, ilaca dirençli lösemi hatları için ve fotodinamik tedavide antagonistler olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca lazer teknolojisinde boyalar ve biyomoleküllerin görselleştirilmesi için pH'a duyarlı floresan malzemeler olarak uygulanırlar. Veteriner hekimlik alanında yeni hastalıklar nedeniyle, bu bileşiklerin uygulanması çok faydalı olabilir ve literatürde Veteriner araştırma alanındaki benzer bileşiklerin aktivitesi açıklanmaktadır. Bu derlemede ksanten türevlerinin antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antiprotozoal, antikanserojenik ve antidiyabetik aktivite gibi en önemli aktiviteleri ve etki mekanizmaları sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ksanten türevleri, Farmakolojik aktiviteler, Veterinerlik.

✉ Elma Veljović

University of Sarajevo, Faculty of pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.
e-posta: elma.veljovic@ffsa.unsa.ba

INTRODUCTION

The spread of zoonoses from animals to humans has been specifically described from 20th to the 21st century. It is evident that these zoonoses often cause high mortality or create enormous financial losses in livestock production. The worrying phenomenon is the so-called. "technopathy" occurring in intensive livestock production, where a large number of animals are intensively raised in a relatively small area with the aim of obtaining extra profits. In such an unnatural environment for animals, new diseases of unclear etiology are emerging, and definitely new drugs are needed to be effective in preserving the health of people and animals.

Resistance to already known antibiotics is a burning problem. Drugs that have antibacterial activity increasingly show weaknesses in the fight against various strains of bacteria. Bacterial cells most often produce resistance not only through one, but also through multiple mechanisms, so there is a known high resistance to certain β -lactam, aminoglycoside and macrolide antibiotics. An example of this may be pneumonia, which the World Health Organization has identified as one of the six diseases that account for over 90% of all human illnesses. Pneumonia belongs to acute respiratory infections, causing bacteria *Streptococcus pneumoniae*, and if not treated, it can cause death very quickly. Although, benzylpenicillin has been used as medication choice for pneumonia, today it is known that certain strains of the bacteria developed high resistance rates for erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tetracycline, which reduced the number of drugs in the treatment (1).

Given the development of resistance to antimicrobial therapy and the emergence of new pathogenic strains, there is a permanent need to find new pharmacologically active substances that will be used to prevent and/or treat people and animals. The development of new drugs is a long-lasting and costly

process, and in order to rationalize the time and money spent on finding and synthesizing new drugs, rational drug design is often used. Also, attention is paid to isolation and semi-synthetic production of compounds from natural materials. One such group of compounds are xanthane compounds whose pharmacological use has been known since the '70s of the last century. In 1968, Bhattacharya described the diuretic and cardiac effects of natural glycosides of mangiferin (2).

1. Structure of Xanthene

A large number of xanthene compounds have a wide range of action on human and animal organisms. The pyranic ring has main responsibility for it (Figure 1), which can react with other substrates, where xanthene derivatives are formed as products. The most prominent among them are xanthenes.

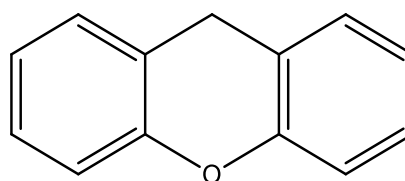


Figure 1. Structure of xanthene.

Şekil 1. Ksantenin yapısı.

The Xanthenes isolated so far may be classified into five major groups: simple oxygenated xanthenes, xanthenes glycosides, prenylated xanthenes, xanthonolignoids and miscellaneous.

Simple oxygenated xanthenes are subdivided according to the degree of oxygenation into non-, mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, and hexaoxygenated substances.

Xanthenes glycosides can be classified into C-glycosides and O-glycosides. In C-glycosides, C-C bond links the sugar moiety to the xanthone nucleus and they are resistant to acidic and enzymatic hydrolysis whereas the O-glycosides have typical glycosidic linkage. Mangiferin and isomangiferin are the most common C-glycosides, while first O

glycoside was norswertianin-1-O-glucosyl-3-O-glucoside isolated from *S. perennis*.

The occurrence of prenylated xanthenes is restricted to the plant species of the family Guttiferae. The major C5 unit of the substituents included the commonly found 3-methylbut-2-enyl or isoprenyl group as in isoemerellin and the less frequent 3-hydroxy-3-methylbutyl as in nigrolineaxanthone P. The most important prenylated xanthenes are caloxanthone O and caloxanthone P, which were isolated from *Calophyllum inophyllum*.

Naturally occurring xanthonolignoids are rare, so only five compounds are known. The most important are cadensin C and cadensin D from *Vismia guaramirangae* and *Hypericum canariensis*, Cadensins A and B from *Caraipa densiflora*.

Xanthenes with substituents other than those mentioned above are included in miscellaneous group. Xanthofulvin and vinaxanthone are the most important in this class and were isolated from *Penicillium* species (3).

Xanthen derivatives exhibit various pharmacological effects such as antibacterial, antifungal (4), antihelminthic, antiallergic (5), antiprotozoal, antioxidant (6), gastroprotective (7) and antidiabetic (8). Also, xanthenes possess an antidepressant action and an antitubercular activity, while xanthone glycosides have a depressive action. A choleric, diuretic, antimicrobial, antiviral and cardiotoxic action of some xanthenes has also been established. The inhibition of Type A and Type B monoamine oxidases by a number of xanthenes have also been observed (9).

The latest study (10) indicates that xanthen derivatives do not have genotoxic activity at the tested concentrations, but had good antiproliferative effect, which is another reason for their further examination.

2. Antibacterial Effect of Xanthene Compounds

A large number of published papers describe the antibacterial activity of natural or synthetic xanthenes or its derivatives.

Tantapakul et al. (11) examined the effect of xanthen isolated from the plant *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium* to Gram positive *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and Gram negative *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and they came to the conclusion that some isolated xanthen derivatives show good antimicrobial effects on *M. luteus*, *B. cereus*, *S. epidermidis* with minimal inhibitory concentration (MIC) 4-8 µg/ml and on *P. aeruginosa* MIC 4 µg/ml, *S. aureus* MIC 8 µg/ml and *S. Typhimurium* MIC 4 µg/ml.

In Stoil's study et al. (12) it has been proved in vitro effect of mangiferin (Figure 2), xanthen isolated from the plant *Mangifera indica* L. on *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus*, *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *Klebsiella pneumoniae* and *Saccharomyces cerevisiae*, whereby it was observed that the less concentrations of mangiferin till 20%, solutions prepared in polyethylene glycol-400, were necessary for inhibiting Gram positive bacteria. The most sensitive strain was *B. pumilus*, while slightly more concentration was required to inhibit Gram negative bacteria (30 till 35%), and the most sensitive strain was *S. agona*. In any of the tested concentrations 8-35%, mangiferin didn't show activity on *P. aeruginosa*.

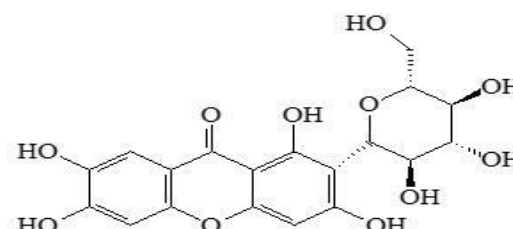


Figure 2. Structure of Mangiferin.

Şekil 2. Magniferinin yapısı.

One of the most widespread hospital infections is the meticillin-resistant type *Staphylococcus aureus* MRSA. Studies have shown that xanthenes α -mangostin and rubraxantone, isolated from some plants of the Guttiferae family show good activity on this form of the bacteria (13). Thus, isolated α -mangostin had MIC 1.57-12.5 $\mu\text{g/ml}$, while rubraxantone had MIC 0.31-1.25 $\mu\text{g/ml}$, which is even better than the vancomycin antibiotic that had MIC 3.13-6.25 $\mu\text{g/ml}$.

The activity of α -mangostin and β -mangostin, xanthenes isolated from the *Garcinia mangostana* plant L. on MRSA was also examined in the study Sakagami et al. (14). Also, there were examined effects of these xanthenes in combination with commercially available antibiotics, ampicillin, gentamicin, minocycline and vancomycin hydrochloride. Results showed that α -mangostin, individually and in combination with vancomycin hydrochloride, has an extremely good effect on MRSA.

Tuberculosis, a disease caused by bacteria *Mycobacterium tuberculosis* is the cause of millions of deaths worldwide, although for many years there has been approved therapy and vaccination. In the study Szkaradek et al. (15) newly synthesized 2-xanthen derivatives, 2-(2-(4-(2-(4-chloro-3-methylphenoxy) ethyl) piperazin-1-yl) ethoxy)-9H-xanthen-9-one, 2-(4-(2-(4-chloro-3-methylphenoxy) ethyl) piperazin-1-yl) methyl)-9H-xanthen-9-one dihydrochloride and ethyl 4-(2-hydroxy-3-oxo-9H-xanthen-2-yl)oxy) propyl piperazine carboxylate, have shown inhibitory effects on *Mycobacterium tuberculosis*, but they also had a cytotoxic effect.

Recent studies of natural xanthenes have shown that α -mangostin have good activity according to *Mycobacterium tuberculosis* with MIC from 62 $\mu\text{g/mL}$ (16), while in study Sudta et al. (17) it has been shown that monoalkyl tetrahydro- α -mangostin analogs show an even better antibacterial effect than α -mangostin alone. Best results had 6-methoxytetrahydro- α -mangostin with MIC 0,78 $\mu\text{g/mL}$.

Study Veljovic et al. (18) describe antimicrobial activity of new synthesized xanthen-3-on derivatives in vitro against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The results showed that all derivatives have good antimicrobial activity, but those with bromine and hydroxyl group in structure had stronger antimicrobial activity. Also, one more study (19) showed that some of new xanthen derivatives have very good antimicrobial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, so it is clearly that this is a field to work on it.

The exact mechanism of action of xanthen derivatives is still unknown, but it is thought that they exert their activity by some of the following mechanisms: tree lignification, enzyme inhibition, phosphodiester reactions, alkylation and DNA cross-linking (20).

3. Antihelmintic Effect of Xanthen Compounds

Ecto and endo parasites in veterinary medicine represent a significant problem, adversely affecting the health of animals, and contributing to significant material losses in livestock production. All domesticated animals, including pets and laboratory animals, are subject to a large number of different parasitosis. The survivors of intensive farm breeding, in controlled conditions of nutrition and keeping, are minimally exposed to ecto and endo parasite infestations. The same applies to pets and laboratory animals. However, ruminants with an extensive way of keeping throughout the grazing season, from early spring to late autumn, are exposed to infections of various types of parasites daily, ranging from flat worms big and small mites, ribbons, echinococcus and round worms pulmonary and intestinal strongylides, etc. to ticks and insects ixodides, acarids, flakes and other.

As a result of the infection of animals, there are large losses in the livestock industry. Specifically, large amounts of internal organs are discarded in slaughter (21).

In a retrospective four-year study of the parasites of the mountain-mountain regions of Bosnia and Herzegovina, complete parasitology sections have been examined 5.805 rats, and a positive finding was found in 5084 animals or 87.6%. The obtained results indicate that the highest incidence is at sheep, during the entire period of the study, was related to dicrocelia, among others, to cattle on fasciolosis and paramfistomosis (22). These facts support the fact that the possible use of natural or synthetic xanthene compounds that exhibit antihelmintic activity has made significant benefits in veterinary curative.

In study Keiser's et al. (23) was examined the effect of natural xanthene, mangostin, isolated from the plant *Garcinia mangostana* and its synthetic derivative, mangostin diacetate on nematodes *Heligmosomoides polygyrus*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Trichuris muris* and trematode *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*. Both compounds did not show positive effects, except for exceptionally poor activity on *A. ceylanicum*. On trematodes, mangostin showed very poor performance, while mangostin diacetate had a slightly better effect on *S. mansoni* i *E. caproni*.

Ondeyka et al. (24) examined the action of xanthol (Figure 3) and confirmed its insecticidal and antihelmintic effect on *Aedes aegypti*, *Lucilia sericata* i *Haemonchus contortus*.

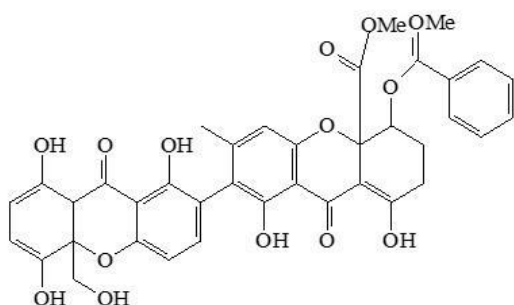


Figure 3. Structure of Xanthol.

Şekil 3. Ksantolun yapısı.

More frequent occurrence of zoonosis caused by infection *Opisthorchis viverrini* in the area of Southeast Asia is a major problem. In humans,

infection occurs after the consumption of raw fish that is contaminated with larvae of said trematode. As a result of the infection, various liver diseases such as hepatitis, cholangitis and cancer occur in animals.

Aukkanimart R. et al. (25) examined the effect of xanthenes isolated from the plant *Garcinia mangostana* on the indicated trematode and found that in addition to antiinflammatory and antioxidant action, the extract can be effective in controlling the spread of the infection caused by *Opisthorchis viverrini*. In experimental animals infected with this trematode and treated with extract of the plant, it was observed that the growth of reproductive organs was inhibited, resulting in a decrease in the number of parasite eggs.

Xanthene derivatives show anthelmintic activity. It is still unclear, but it is considered that they possess this activity through inhibiting microtubule synthesis in nematodes, thus irreversibly impairing glucose uptake. As a result, intestinal parasites are immobilized or die slowly (26).

4. Antiprotozoal Activity

Malaria is a disease caused by four types *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*. Xanthenes represent potential antimalarials. Garciniaxanthon B (Figure 4), isolated from the plant species *Garcinia subelliptica*, shows very good activity towards *Trypanosoma cruzi*.

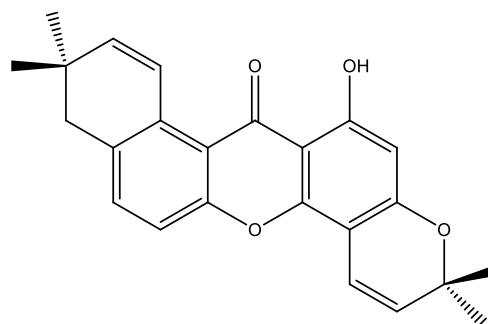


Figure 4. Structure of Garciniaxanthon B.

Şekil 4. Garsiniaksanton B'nin yapısı.

Hydroxyxanthenes have been identified as the new antimalarial agents. It is believed that this

activity is expressed by complexing the HEM and inhibiting the formation of hemosins (27,28).

In 1986, Ampofo isolated dimethylcalabaxanthone and calotvaitesixantone from *Calophyllum caledonicum* species. It is believed that these two xanthonic derivatives exhibit their antimalarial activity due to the position of the hydroxyl groups on the xanthone core, the presence of the piran cycle and the dimethylalyl chain. (29)

Riscoe synthesized 3,6-bis(ω -N,N-dietilaminoamiloksi)-4,5-difluoroksanton (F2C5) (Figure 5) which showed good activity towards resistant strains *Plasmodium falciparum* (30). The existence of xanthone structure is the most important for antimalarial activity. It is believed that the carbonyl bridge coordinates with iron in the structure of the heme. Also, the aromatic rings F2C5 react with the aromatic rings of the heme, so that this xanthone exhibits its antimalarial activity by interfering with the structure of the heme that is important for the life cycle *Plasmodium falciparum* (31,32).

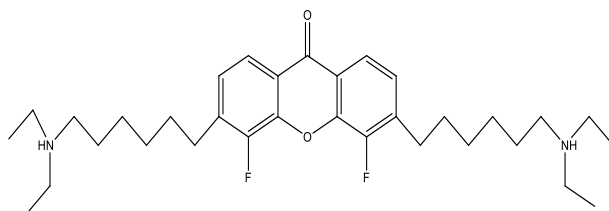


Figure 5. Structure of 3,6-bis (ω -N,N-dietilaminoamiloxy)-4,5-difluoroxanthon (F 2 C 5).

Şekil 5. 3,6-bis (ω -N,N-dietilaminoamiloxy)-4,5-difluoroxanthon (F 2 C 5)'nin yapısı.

The exact mechanism by which xanthene derivatives exert an antiprotozoal effect is still unknown, it is considered that they thought the inhibit the enzyme trypanothione reductase they stop the growth and further replication of the protozoa (33).

5. Antifungal Activity

Although bacterial and viral infections are more common, fungal infections do not have the same characteristics. This is especially expressed in people with immunodeficiency, whether it is primary or

secondary, so that the search for new compounds with antifungal activity is constant.

Fukai et al. (34) examined the effects of xanthene derivatives isolated from the plant *Cudrania cochinchinensis* on *Candida*, *Cryptococcus* and *Aspergillus* types of fungus. Results of the study have shown that cudraxantone S and toxyloxanthone C (Figure 6) show antifungal activity against fungi *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* and *Candida glabrata*.

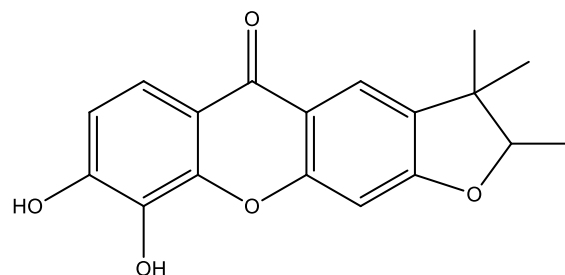


Figure 6. Structure of Toxyloxanthone C.

Şekil 6. Toksiloksanton C'nin yapısı.

Best antifungal effect according to *Candida albicans* species has toxyloxanthone C isolated from *Cudrana fruticosa* with minimal inhibitory concentration 25 μ g/ml (35).

Marona et al. (4) synthesized 20 new 2-substituted xanthenes, and then tested their antifungal action in vitro against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Cryptococcus neoformans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Ten newly synthesized derivatives showed antifungal activity according to *Trichophyton mentagrophytes*, with a maximum inhibition band of 35mm, while it 2-3-allylaminopropoxy-9H-xanthen-9-one hydrochloride acted on all examined strains of fungi.

CONCLUSION

In literature are described a various pharamcological effects of xanthene derivatives.

Sometimes, at certain concentrations, xanthenes show resistance to some microbes, but that does not mean that at other concentrations they cannot show a positive effect, which also indicates

the need for new synthesis of xanthene derivatives, as well as further studies on other pharmacological effects.

This would give a more insight into the effectiveness of xanthen derivatives in human and veterinary medicine.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Cai K., Wang Y., Guo Z., Xu X., Li H., Zhang Q., 2018. Clinical characteristics and antimicrobial resistance of pneumococcal isolates of pediatric invasive pneumococcal disease in China. *Infect Drug Resist*, 11, 2461-2469.
2. Fotie J., Bohle DS., 2006. Pharmacological and biological activities of xanthenes. *Anti-Infect Agent Med Chem*, 5, 15-31.
3. Negi JS., Bisht VK., Singh P., Rawat MSM., Joshi GP., 2013. Naturally occurring canthones: chemistry and biology. *J App Chem*, 1, 1-9.
4. Marona H., Szkaradek N., Karczewska E., Trojanowska D., Budak A., Bober P., Przepiorka W., Cegla M., Szneler E., 2009. Antifungal and Antibacterial Activity of the Newly Synthesized 2-Xanthone Derivates. *Arch Pharm (Weinheim)*, 342, 9-18.
5. Garcia D., Escalante M., Delgado R., Ubeira FM., Leiro J., 2003. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytother Res*, 17, 1203-1208.
6. Veljovic E., Spirtovic-Halilovic S., Muratovic S., Valek Zulj L., Roca S., Trifunovic S., Osmanovic A., Davorka Z., 2015. 9-Aryl substituted hydroxylated xanthen-3-ones: Synthesis, structure and antioxidant potency evaluation. *Croat Chem Acta*, 88, 121-127.
7. Mariano LN., Da Silva LM., De Souza P., Boeing T., Somensi LB., Bonomini TJ., Delle Monache F., Cechinel Filho V., de Andrade SF., Niero R., 2016. Gastroprotective xanthenes isolated from *Garcinia achachairu*: Study on mucosal defensive factors and H (+), K(+)-ATPase activity. *Chem Biol Interact*, 258, 30-39.
8. Ironi EA., Oboh G., Akindahunsi AA., 2016. Antidiabetic effects of *Mangifera indica* Kernel Flour-supplemented diet in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Food Sci Nutr*, 4, 828-839.
9. Peres V., Nagem TJ., 1997. Naturally occurring, penta-oxygenated, hexa-oxygenated and dimeric xanthenes: A literature survey. *Quimica Nova*, 20, 388-397.
10. Veljovic E., Spirtovic-Halilovic S., Muratovic S., Osmanovic A., Haveric S., Haveric A., Hadzic M., Salihovic M., Malenica M., Sapcanin A., Završnik D., 2019. Antiproliferative and genotoxic potential of xanthen-3-one derivatives. *Acta Pharm*, 69, 683-694.
11. Tantapakul C., Maneerat W., Sripisut T., Ritthiwigrom T., Andersen RJ., Cheng P., Cheenpracha S., Raksat A., Laphookhieo S., 2016. New Benzophenones and Xanthenes from *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium* and Their Antibacterial and Antioxidant Activities. *J Agric Food Chem*, 64, 8755-8762.
12. Stoilova I., Gargova S., Stoyanova A., Ho I., 2005. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. *Herba Polonica*, 51, 1-2.
13. Iinuma M., Tosa H., Tanaka T., Asai F., Kobayashi Y., Shimano R., Miyauchi K., 1996. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Pharmacol*, 48, 861-865.
14. Sakagami Y., Iinuma M., Piyasena KG., Dharmaratne HR., 2005. Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine*, 12, 203-208.
15. Szkaradek N., Stachura K., Waszkielewicz AM., Cegla M., Szneler E., Marona H., 2008. Synthesis and antimycobacterial assay of some xanthone derivatives. *Acta Polon pharm*, 65, 21-28.

16. Guzman-Beltran S., Rubio-Badillo MA., Juarez E., Hernandez-Sanchez F., Torres M., 2016. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and α -mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *Int Immunopharm*, 31, 149-157.
17. Sudta P., Jiarawapi P., Suksamrarn A., Hongmanee P., Suksamrarn S., 2013. Potent activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of α -mangostin analogs. *Chem Pharm Bull*, 61, 194-203.
18. Veljovic E., Spirtovic-Halilovic S., Muratovic S., Salihovic M., Novakovic I., Osmanovic A., Zavrnsnik D., 2018. Antimicrobial activity and docking study of synthesized xanthen-3-on derivatives. *RJPBCS*, 9, 777-783.
19. Veljovic E., Spirtovic-Halilovic S., Kahrovic E., Roca S., Novakovic I., Osmanovic A., Salihovic M., Alagic D., Benjamin H., Dzenana L., Zavrnsnik D., 2016. Solvent-free Synthesis and Antibacterial Activity of 14-Aryl Substituted Dibenzoxanthene Derivatives. *Bull Chem Tech Bosnia and Herzegovina*, 46, 33-38.
20. Futuro DO., Ferreira PG., Nicoletti CD., Borbasantos LP., Da Silva F., Rozental S., Ferreira VF., 2018. The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. *Ann Acad Bras Cienc*, 1, 90.
21. Moro P. and Schantz M.P., 2009. Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 125-133.
22. Zuko A., 1999. Parasites and parasitoses in ruminants in the upland regions in Bosnia and Herzegovina. *Veterinaria*, 48, 95-120.
23. Keiser J., Vargas M., Winter R., 2012. Anthelmintic properties of mangostin and mangostin diacetate. *Parasitol Int*, 61, 369-371.
24. Ondeyka JG., Dombrowski AW., Polishook JP., Felcetto T., Shoop WL., Guan Z., Singh SB., 2006. Isolation and insecticidal/anthelmintic activity of xanthonol, a novel bis-xanthone, from a Non-sporulating fungal species. *J Antibiotics*, 59, 288-292.
25. Aukkanimart R., Boonmars T., Sriraj P., Songsri J., Laummaunwai P., Waraasawapati S., Boonyarat C., Rattanasuwan P., Boonjaraspinyo S., 2015. Anthelmintic, anti-inflammatory and antioxidant effects of *Garcinia mangostana* extract in hamster opisthorchiasis. *Exp Parasitol*, 154, 5-13.
26. Garcia-Bustos JF., Sleebs BE., Gasser RB., 2019. An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. *Parasit Vectors*, 12, 306.
27. Scott H., Ralf W., 2007. One-pot synthesis of new symmetric and asymmetric xanthene dyes. *Tetrahedron Lett*, 48, 4383-4385.
28. Shao-liang Z., Philp C., 2005. Synthesis, structures, photoluminescence and theoretical studies of xanthone in crystalline resorcinarene-based inclusion complexes. *Chem Eur J*, 11, 3583-3590.
29. Sousa E., Correia da Silva M., Pinto M., 2009. In: *Natural Products Chemistry, Biochemistry and Pharmacology*, Ed., Narosa Publishing House PVT. LTD., 392-416, West Bengal, India.
30. Eunice MT., 2006. Antiprotozoal activity against plasmodium falciparum and trypanosoma cruzi of xanthenes isolated from *chrysochlamys tenuis*. *Pharm Biol*, 7, 550-553.
31. Fotie J., Bohle S., 2006. Pharmacological and biological activities of xanthenes. *Curr Med Chem-Anti-Infect Agents*, 5, 15-31.
32. Pinto M., Castanheiro R., 2009. In: *Natural Products Chemistry, Biochemistry and Pharmacology*, Ed., Narosa Publishing House PVT. LTD., 520-675, West Bengal, India.
33. Kaiser M., Maser P., Tadoori LP., Loset JR., Brun R., 2015. Antiprotozoal activity profiling of approved drugs: A starting point toward drug repositioning. *PLOS ONE*, 10, 8.
34. Fukai T., Yonekawa M., Hou AJ., Nomura T., Sun HD., Uno J., 2003. Antifungal agents from the roots of *Cudrania cochinchinensis* against *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *J Nat Prod*, 66, 1118-1120.
35. Jean F., Scott B., 2003. Pharmacological activities of xanthenes. *Anti-Inf Agents in Med Chem*, 3, 11-17.



Yenidoğan Buzağılarda Kolostrum Yönetiminin Önemi

Süleyman KOZAT^{1a}✉

1. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0001-5089-2623^a

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
19.03.2019	19.06.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Kozat S: Yenidoğan Buzağılarda Kolostrum Yönetiminin Önemi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,14(3): 343-353, 2019.
DOI: 10.17094/ataunivbd.541789.

Öz: Kolostrum; yeni doğan buzağuların ilk 28 gününde hastalıklara karşı immunitenin oluşması için annelerinden alması gereken özel ve önemli bir süttür. Buzağılara kolostrum verilmesi neonatal dönemdeki buzağının hayatta kalmasını ve sağlığının korunmasını sağlayan en önemli faktördür. Birçok ülkede buzağı ölümlerinin önemli nedenlerinden biride buzağuların yeterli miktarda kolostrum almamasıdır. Doğan buzağıya doğumdan sonraki ilk 6 saat içinde ilk öğünde buzağı vücut ağırlığının yaklaşık %5'i kadar ve ilk günde ise 3-4 öğünde buzağının vücut ağırlığının %10'u kadar kolostrum verilmelidir. Neonatal dönemdeki buzağılara belirtilen süreç ve miktarlarda uygun özellikte ve yeterli düzeyde kolostrum verilmemesi durumunda, buzağılarda pasif transferi yetmezliği ortaya çıkmaktadır. Pasif transfer yetmezliği ortaya çıkan yenidoğan buzağılarda antikor alım düzeyinde düşüşler gözlenir. Bu durumda; buzağı ölüm oranında artışa, buzağı sağlığı, refahı ve verimliliği ile ilişkili birçok kısa ve uzun vadeli kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle neonatal dönemdeki buzağı ölüm oranının düşürülmesi ve hastalıklara karşı direncinin artırılması için başarılı bir kolostrum yönetim programı uygulanmalıdır. Bu çalışmada, etkili bir kolostrum yönetim programının sağlanması ve izlenmesinin temel bileşenlerinin tartışılmasının yanı sıra kolostrum süreci gözden geçirilecek ve neonatal dönemde görülen hastalıklar ile kolostrumun önemli bileşenleri arasındaki ilişkiler hakkında detaylı bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Kolostrum, Yeni doğan, Yönetim.

The Importance of Colostrum Management in Newborn Calves

Abstract: Colostrum is a special and important type of milk that should be ingested by newborn calves in order to produce immunity against diseases in the first 28 days of life. Giving colostrum to calves is the most important factor for calf survival and maintaining health. In many countries, one of the most important reason for calf deaths is inadequate intake of colostrum. A newborn calf should ingest approximately 5% body weight of colostrum in the first 6 hours as first meal and in the first day, this amount should be 10% of body weight in the first 3-4 meals. Passive transfer failure occurs when the neonatal calves do not ingest adequate and suitable colostrum as stated time and amounts. Besides, passive transfer failure also leads to low intake of antibodies in the calves. This condition leads to increase in death rates, and losses associated with calf health, welfare and productivity. Therefore, a successful colostrum management programme is necessary for decreasing neonatal calf deaths and increasing immunity against diseases. The purpose of this study is to give detailed information related with maintaining and monitoring an effective colostrum programme, as well as discussing the relations between neonatal diseases and important components of colostrum

Keywords: Calf, Colostrum, Management, Newborn.

✉Süleyman Kozat

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
e-posta: skozat@hotmail.com

GİRİŞ

Yenidoğan buzağuların hastalık ve ölümleri hayvancılık sektöründeki ekonomik kaybın önemli nedenlerindedir (1,2). Kolostrum yenidoğan yavruların büyümesi ve sağlığı için önemlidir. Kolostrum içerdiği antikor (immunoglobulin) kompleman sistemi sayesinde geniş bir antimikrobiyal etkiye sahiptir ve buzağının kendi bağışıklık sistemi olgunlaşana kadar buzağıda pasif immunité sağlar. Normal süt de yenidoğan buzağular için ana besin kaynağıdır ve buzağının büyümesi-gelişmesi için gerekli olan proteinleri, mineralleri, karbonhidratları, yağ asitlerini, büyüme faktörlerini ve bağışıklık modülatörlerini içerir. Ayrıca inek sütünün insanlarda bağışıklık sağlama için bir araç olabileceği ve çeşitli bakteriyel ve viral antijenlere karşı aşılınmış ineklerden elde edilen "hiperimmün" sütün, patojenlerin bağırsak epiteline invaze olmasını ve istila etmesini önlediği bildirilmektedir (3). Süt ve süt ürünleri hem insan hem de hayvan sağlığı bakımından işlevsel gıdalar olarak kullanılabilmesi önerilmektedir (3,4). Neonatal dönem buzağının fizyolojik durumu, sağlık durumu ve hayatta kalması açısından önemli bir dönemdir (5). Buzağı yönetimi uygulamaları buzağı morbiditesini ve mortaliteyi azaltmak için yıllar içinde geliştirse de, halen neonatal dönemdeki buzağı hastalıklarının %9 düzeyinde olduğu ve buzağı ishali ile diğer sindirim hastalıklarının buzağı ölümlerinin %62'sini oluşturduğu bildirilmektedir (6). Sığır kökenli kolostrum yıllardır popüler tıpta bilinmekte ve hem insanların hemde evcil hayvanların bulaşıcı hastalıklarından korunmasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (7).

1. Buzağılarda Neonatal Dönem

Buzağılarda neonatal dönem fizyolojik fonksiyonların gelişiminde kritik bir aşamayı oluşturmaktadır. Adaptif (uyum) dönem olarak da bilinen bu aşamada, ekstra-uterine uyumu için buzağının vücut sistemi gerekli değişiklikleri yapmak zorundadır (2). Yenidoğanlar, metabolik olarak

intrauterin ortama göre oldukça farklı koşullara sahiptir. Bu nedenle yenidoğanlar özellikle perinatal hastalıklara karşı hassas olup, yüksek mortalite riskiyle karşı karşıyadır (8). Buzağı yetiştiriciliğinin temel amacı, hedef sürü büyüklüğünü sağlayan sağlıklı buzağı yetiştirmektir. Buzağı yetiştirme programının başarısı; buzağı ölüm oranının azaltılması ve günlük canlılık artışının sağlanmasıdır (9). Birçok araştırmacı yenidoğan hastalıklarının teşhis ve tedavisi için doğumun ilk haftasında asit-baz dengesindeki değişiklikler ve pıhtılaşma profilleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Neonatal dönemdeki yavrularda fizyolojik referans değerlerine sahip olmanın önemini göz önüne alındığı araştırmalarda, özellikle rektal sıcaklık, kalp ve solunum hızları takip edilmiştir. Ayrıca doğumun ilk haftasındaki buzağılarda biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri değerlendirmek için; total protein (TP), total kolesterol, trigliseritler, glukoz, esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA), üre, kreatinin, kolinesteraz, laktat dehidrojenaz (LDH), hidrosibütirat, glutamat piruvat transaminazlar (GPT), glutat oksat transaminler (GOT), direk ve indirek bilirubin, magnezyum, demir, potasyum, fosfor, klorür ve sodyum düzeyleri araştırılmıştır (2). İlk kolostrum, yenidoğan buzağıyı bulaşıcı hastalıklara karşı koruyan, annenin lökositlerini de içeren önemli bir besin kaynağı, immunoglobulinler ve diğer önemli bağışıklık faktörlerini de içeren bir özelliğe sahiptir (10).

2. Kolostrum ve Bileşimi

Kolostrum, doğumdan sonra salgılanan ilk süt olup yenidoğanın sağlığı için önemli olan immunoglobulinler, sitokinler, besin elementleri ve büyüme faktörlerini içerir (4,11). Kolostrum, buzağılarda bulaşıcı maddelere karşı ilk korunma mekanizmasını sağlar (12). Yaşamın kritik ilk 24 saatinde uygun kalitedeki yeterli kolostrumun alınmasının önemi kanıtlanmıştır (13). Kolostrumun içeriğinde bulunan immunoglobulinler annenin

kanından meme bezlerine taşınması, doğumdan birkaç hafta önce başlar ve doğumdan 1-3 gün önce en yüksek seviyesine ulaşır (14). Doğum yapan inekler doğumdan sonraki ilk 7 gün boyunca kolostrum salgılar. Sığır kolostrumunda, immunoglobulinler total protein içeriğinin %70-80'ini oluştururken, normal sütte total proteinin sadece %1-2'sini oluşturmaktadır (12). Kolostrumun yüksek düzeyde immunoglobulin içermesi yenidoğan buzağında pasif bağışıklığın sağlanması ve bağırsak düzeyinde lokalize olmasında önemli rol oynar (13). İmmunoglobulinler memeli kan dolaşımında yabancı antijenlere tepki olarak lenfositler tarafından üretilen, vücudu patojenik organizmalardan koruyarak ve hastalıklara karşı direnç sağlayarak immunolojik mekanizmada önemli rol oynayan plazma proteinleridir (12). Buzağıdaki immunoglobulin düzeyi, alınan kolostrum miktarı ve kolostrumdaki Ig konsantrasyonuna bağlıdır (13). Kolostrum yönetimi, buzağı sağlığını ve sürü büyüklüğünü korumada en önemli yönetim faktörüdür (15). Annenin immunoglobulinler tablosu ve immunolojik hafızası, anneden yavrulara ya gebelik döneminde fetüse plasenta yoluyla ya da yenidoğanlara memeden gelen kolostrum yoluyla gastrointenzital sisteme geçer (4). Ruminantlar ve tek tırnaklı hayvanlarda immunoglobulinlerin plasenta yoluyla yavruya geçmesi mümkün değildir (8,12). Buzağlarda immünoglobulinlerin (Ig), diğer kolostral komponentlerle birlikte sindirim sisteminden absorpsiyonu, pasif transfer immünitesi olarak tanımlanır (4,12). Bu tür hayvanların yavruları hemen hemen hiç antikor almadan doğar ve dolayısıyla bağışıklık sistemi anneden alınan kolostruma bağlıdır. Kolostrum, neonatal dönemdeki buzağlarda immun fonksiyonlara destek görevi yapan birçok bileşiği içerir (16). İneklerde kolostral immunoglobulinin %90'ından fazlası immunoglobulin G (IgG) olup ve doğumdan sonra ilk sağımda ortalama konsantrasyonu yaklaşık 60 gr/L'dir. IgG konsantrasyonu, 12. süt sağımında keskin bir düşüşle (18) yaklaşık 1 gr/L'ye düşer ve normal sütte 0.5 gr/L'ye kadar iner (4). Kolostrum immunoglobulin M

(IgM), IgG, immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin D (IgD) ve immunoglobulin E (IgE)' yi içerir. Sığır kolostrumunda mevcut olan toplam immunoglobulinlerin %85 ile %90'ını içeren IgG, doğumdan önce meme bezinde biriken meme epiteli boyunca kandan transfer edilmektedir (11). Kolostrumun bileşimde Ig'ler sırasıyla %85-90 oranında IgG, %7-10 IgM ve %5 IgA gruplarından oluşmaktadır. Kolostrumdaki Ig düzeyleri bireysel olarak değişmekle birlikte ortalama kolostral IgG, IgM ve IgA düzeyleri sırasıyla 7500, 440 ve 490 mg/dl olarak bildirilmiştir (17). Kolostrumdaki IgG konsantrasyonu buzağı sağlığı ile doğrudan ilgilidir ve bu nedenle kaliteyi belirlemede önemli ölçüttür (15). Sığırlarda kaliteli bir kolostrum için IgG konsantrasyonu 50 g/L olarak bildirilmiştir (11). Bu antikor; opsonizasyon, kompleman fiksasyon, patojen yapışmasının önlenmesi, bakteriyel metabolizmanın engellenmesi, bakteriyel aglütinasyon, virüslerin ve toksinlerin nötralizasyonu gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir (18). Sığır kolostrumundaki ana immunoglobulin G; IgG₁ ve IgG₂ olmak üzere iki temel alt sınıfa ayrılmakta (12) ve immunoglobulin G₁ tüm immunoglobulinlerin yaklaşık %50-80'ini oluşturmaktadır (4). Kolostrumdaki IgG₁ konsantrasyonu, meme alveoler epitel hücrelerinin üzerindeki reseptörler tarafından kolaylaştırılır. Glandüler epitel hücreleri laktasyonun başlangıcında bu reseptörü eksprese eder. Değişmiş ekspresyon büyük olasılıkla artan prolaktin konsantrasyonuna cevap olarak ortaya çıkar (14). Sütteki IgG₁ konsantrasyonu genetik ve hormonal etkiler, yaş, beslenme durumu ve ineğin laktasyon evresi gibi birçok faktörden etkilenir (13). Bunlara ek olarak; laktasyon sayısının, özellikle ilk üç laktasyonun IgG₁ konsantrasyonunu ve kütlelerini etkileyen en önemli faktörler olduğu bildirilmiştir (12). İmmünoglobülin transferini etkileyen faktörler kolostrum alımının zamanlaması, kolostrum uygulamasının yöntemi, alınan kolostrumun immunoglobulin konsantrasyonu, annenin ırkı ve yaşıdır. Bu faktörler çoğunlukla buzağıdaki pasif aktarım üzerinde etkilidir (14). Kolostral

immunoglobulinlerin yetersiz transferine sahip buzağlarda, ilk 12 haftada mortalite riskinin arttığı ve canlı ağırlık artış oranının düştüğü bildirilmiştir (19).

Tablo 1. Kolostrumun biyolojik olarak aktif bileşenleri (17).

Table 1. Biologically active components of colostrum (17).

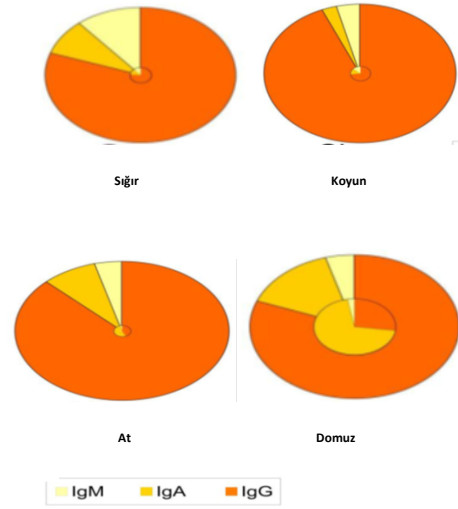
Antimikrobiyel faktörler	Büyüme faktörleri ve hormonlar	Besinler
İmmunoglobülinler	İnsülin-benzeri büyüme faktörü	Yağ
Lizozim	Epidermal büyüme faktörü	Laktoz
Laktoferrin	Transforming büyüme faktörü	Proteinler
Laktoperoksidaz	Büyüme hormonu	Vitaminler
Sitokinler	İnsülin	Mineraller

Tablo 2. Süt ve Kolostrum Kompozisyonu (20).

Table 2. Composition of bovine colostrum and mature milk (20).

Besin	Kolostrum	Doğum sonrası 14. gündeki süt
TP (%)	17.12	3.57
Yağ(%)	4.69	5.26
BE (Mj/L)	6.0	2.8
HP (gr/L)	133	32
Ig G (gr/L)	81	<2
LCF (gr/L)	1.84	0.34
Transferrin (gr/L)	0.55	0.21
GGT (U/L)	509	52
ALP (U/L)	19	4
AST (U/L)	1.5	0.1
TNF (µg/L)	5	<2
İnsülin (µg/L)	65	1
Glukagon(µg/L)	0.16	0.01
Prolaktin (µg/L)	280	15
BH (µg/L)	1.4	<1
IGF-I (µg/L)	310	<2
IGF-II (µg/L)	150	-

ALP: Alkaline fosfat, AST: Aspartat amino transferaz, BE: Brüt enerji, Ig G: İmmunoglobulin G, GGT: Gamma glutamiltransferaz, HP: Ham protein, LCF: Laktoferrin, TP: Total protein, IGF-I: İnsülin benzeri büyüme faktör-I, IGF-II: İnsülin benzeri büyüme faktör-II, TNF: Tümör Nekroz Faktör, BH: Büyüme hormonu



Şekil 1. Sığır, koyun, at ve domuz kolostrumları (dış daire) ve sütlerindeki (iç daire) IgG, IgA ve IgM düzeylerinin oransal dağılımı (21).

Figure 1. Relative distribution of IgG, IgA and IgM in colostrum (outer circle) and in milk (inner circle) of cattle, sheep, horse and pig (21).

3. Kolostral Antikorlar

İmmünoglobulinler, sütte ve kolostrumda bulunan immunolojik aktivitenin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (21). Kolostral antikorlar, fagositoz ve patojenlerin lökositler tarafından öldürülmesini tetikleyebilir ve enfeksiyon oluşumunda kritik bir adım olan patojenin epitel astarına bağlanmasını önleyebilir (22). Buzağı serumu içindeki yüksek seviyeli kolostral immunoglobülinler, buzağların yaşamlarının ilk haftalarında sağlıklarını ve büyümelerini sağlamanın yanısıra gelecekte dişi buzağların damızlık kullanım şansını artırmaktadır (23). İmmünoglobülinler, meme epitel hücrelerinde reseptör aracılı mekanizmalar ile taşınır ve emilim sırasında meme bezinden çıkar (21). Sığır serumu ve laktal salgıları genel olarak IgG, IgM ve IgA'yı kapsar. İmmünoglobulinler, seçici olarak serumdan meme bezinin içine transfer olur ve ilk kolostrumda çok yüksek konsantrasyonlarda immunoglobulin düzeylerine (40 ± 200 mg/ml) ulaşır (3). Anne sütü yenidoğan yavruları mikrobiyal patojenlere karşı korur (7,12). Doğumdan sonra 12 saat içinde kolostrum almak önemlidir. Aksi takdirde yeni doğmuş buzağlarda ilk haftalarda yüksek mortalite

ve düşük kilo alımı gözlenebilir. Nitekim IgG düzeyi 10 gr/L'den düşük olan yenidoğan buzağlarda mortalite oranlarının yüksek ve pnömoni riskinin iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (12). Kolostrumdaki immunoglobulinler, annenin bağışıklık sisteminden bağımsız değildir (21). Buzağların ilk 14 günündeki ishal ve perinatal enfeksiyonlardan dolayı oluşan ölümlerden dolayı oluşan ekonomik kayıpların küçümsenemeyecek düzeyde olduğu bildirilmiştir (22). Gebe inek, koyun veya domuzun *Enterotoksijenik Escherichia coli*'ye (ETEC) ve bağırsak virüslerine karşı aşılması (24) yenidoğanların immunizasyonunda koruma sağladığı ifade edilmiştir (21). İnaktive edilmiş rotavirüsle aşılanan kısırakların taylarında morbidite %30 iken, aşılanmamış kısırakların taylarında morbidite %80'lere ulaşmıştır (4). Kolostrum ile beslenen buzağlarda, beslenmeyenlere göre BRV ile ilişkili ishal vakaları istatistik olarak önemli derecede daha az gözlenmiştir (25). İmmünolojik olarak aktif hücreler ve laktoferrin gibi çözünebilir mediatörler anneden yavruya kolostrum yoluyla transfer edilmektedir (8,12).

4. Kolostrumun Verilme Zamanı ve Miktarı

Anne sütündeki immunoglobulinler; anneden yenidoğana pasif bağışıklık transferi ve yenidoğanın olgunlaşmamış bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiyi etkiler. Yüzyıllar boyunca maternal immun durum ile yenidoğanın immunolojik korunması ve gelişimi arasındaki bağlantıya önem verilmeyle birlikte ancak on dokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru bilimsel olarak ifade edilmiştir (21). Yenidoğanın hayatta kalması sıklıkla pasif immunizasyon derecesi ile pozitif bir korelasyon göstermekte ve yenidoğan yavrunun dolaşımdaki immunoglobulinleri, özellikle IgG, çevresel antijenlere karşı konakçı savunmasında genel olarak önemli bir rol üstlenmektedir (6,26). İneklerin syndesmochorial plasentası, maternal endometriyum ile fetal trofektoderm arasında maternal ve fetal kan kaynaklarını ayıran uterusu sahip olmaları, immunoglobulinlerin geçişini önleyen bir sınırlama oluşturur (12,14). Sonuç olarak,

buzağlar agamaglobülinemik olarak doğar ve pasif bağışıklık sağlamak için gerekli olan yeterli miktarda kolostral immunoglobulin almaları ve bunların emiliminin sağlanması gerekir (14,27). Yenidoğan buzağların yaşamın ilk 28 gününü kapsayan Neonatal periyotta hastalıklara karşı koruyucu immünitenin sağlanması ve kendi immün sistemlerinin aktifleşmesine kadar geçen süreçte tek yolu kolostrumun alınması ve absorpsiyonudur (12). Yeni doğmuş bir buzağıya, normal serum immunoglobulin G seviyesi 10 g/L olacak şekilde minimum 2 litre kolostrum (120 g immunoglobulin'e eşdeğer miktarda) verilmelidir (4,23).

Kolostrumun, bileşimindeki çeşitli immunoglobulinlerden dolayı buzağıyı enfeksiyöz ajanlara karşı koruyan ilk savunma mekanizması olduğu belirtilmektedir (27). Ayrıca kolostrum buzağıya enerjide sağlamaktadır (12). Yeni doğan buzağlarda kolostrum alınmasını takiben IgG'ler seçici olmayan pinositoz mekanizması ile barsak epitel hücreleri tarafından emilerek ekzositoz ile lenfatik ve daha sonra torasik duktus aracılığı ile kan dolaşımına aktarılır (12,28). Bu nedenle epitelyum hücreleri ilk 4 saat içinde bütün IgG'ler değişikliğe uğramadan maksimum oranda absorbe edilir. Kolostrum alımı ne kadar erken olursa buzağı kanında o kadar fazla antikora rastlanır. Çünkü yeni doğan buzağların barsak epitel hücreleri henüz olgunlaşmadığından yaşamın ilk birkaç saatinde veziküllü ve vakuol yapıdadır. Buzağının immunoglobülin emme yeteneği yaşla birlikte hızla azalır. Bu nedenle buzağların doğumdan sonraki ilk 2 saat içinde kolostrum tüketmeleri önerilir (29). Kolostrumun kalitesinin hayvandan hayvana değiştiği ve inek kolostrumunun düvelere göre daha yüksek antikor konsantrasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir (13). Kolostrumun erken verilmesinin gerekliliğinin bir diğer nedeni de bileşenlerinin seviyesinin ve besleyici değerinin doğumdan sonra hızla azalmasıdır (12,28). Buzağının ihtiyaç duyduğu kolostrum miktarının belirlenmesi ve ilk 3 günde ne kadar kolostrum verileceğinin hesaplanması amacıyla, buzağının canlı ağırlığı dikkate alınmalıdır. Son

yıllarda yapılan çalışmalarda ilk beslemede canlı ağırlığın %10-12'si kadar kolostrumun verilmesi gerektiği rapor edilmiştir. Devam eden günlerde ise canlı ağırlığın %10'unu geçmeyecek şekilde kolostrum veya geçiş sütü iki veya üç öğünde verilmelidir (12,19). Yenidoğan buzağıya ilk kolostrum verilmesinin üzerinden 12 saat geçmeden tekrar verilmesi Ig seviyelerinde 24-48 saat boyunca artışlar yaşanmasına neden olduğu bildirilmiştir (12,28). Pek çok araştırmada yenidoğan buzağlarda hastalıklara karşı koruyan farklı serum immunoglobulin konsantrasyonları açıklanmıştır. Serum Ig konsantrasyonu 10 gr/L'den az olduğunda 24 saatlik buzağı yaşamında pasif transfer yetmezliği geliştiği bildirmişlerdir (14,30,31). Serum IgG düzeyi 10 g/L'den daha az olan buzağlarla ilgili bir başka çalışmada da buzağların, serum IgG düzeyi 10 g/L'den daha yüksek olan buzağlara göre daha fazla hastalık riskinin olduğu bildirilmiştir (32). Ruminantlarda, yeni doğanların immunoglobulinlerinin pasif transferinin yetmezliği çeşitli hastalıklara karşı direncin düşük olmasına neden olur. Buzağı morbidite/mortalitesi ile yenidoğan buzağların azaltılmış maternal immunoglobulin transferi arasında yüksek bir ilişki vardır. Buzağlarda morbidite/mortalite artışı performans düşüklüğüyle birlikte yüksek üretim maliyeti ve düşük karlılığa neden olmaktadır (33).

5. Kolostrum İkame Besinleri

Kolostrum eşdeğeri besin maddeleri, yeterli kolostrum bulunmadığında veya pastörize edilmemiş kolostrum yoluyla bulaşabilecek hastalıkların bulaşmasını önlemek için kullanılır. Neonatal dönemdeki buzağlarda pasif immunitenin sağlanması ya kolostral immunoglobulinlerin alınması ya da kolostrum eşdeğerleri ile sağlanabilir (27). Avrupa'da sığır kolostrumundan hazırlanan çok sayıda kolostrum muadili ürün bulunmaktadır. Beşeri hekimlikte hastalığa neden olan dokulardaki spesifik hedef hücreler ile etkileşime girme, ilaçlar dahil toksik maddeleri etkisiz hale getirme, kanser tanı ve tedavisi için antikörlerin üretilmesi araştırılmıştır.

Buna ek olarak bu antikörler özellikle bağışıklık yetersizliği olan hastalarda, bulaşıcı hastalıkların tedavisi için pasif immunoterapide de kullanılmaktadır (7). İmmunoglobulin izolasyonu ve saflaştırılması için 1980'lerden bu yana bir dizi patentli yöntem geliştirilmiştir. Kolostral veya peynir altı suyu, ultrafiltrasyon (UF) veya UF ve kromatografi kombinasyonları bu yöntemlerden bazılarıdır (3). Maternal kolostrum (MC) alınmadığı durumlarda ticari olarak temin edilebilen kolostrum replasmanları (CR) yönetsel kolaylık sağlamak, pastörize edilmemiş kolostrum yoluyla bulaşabilen hastalıkların bulaşmasını önlemek (27) ve eradikasyon programlarında kalite tutarlılığını sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (34). Endüstriyel olarak üretilen yüksek kaliteli bir kolostrumun; IgG konsantrasyonunun 50 mg/ml'den daha yüksek, total bakteri sayısının 100,000 cfu/ml'den ve koliform sayısının 10.000 cfu/ml'den daha düşük oranda olması gerektiği bildirilmiştir (34,35). Bazı çalışmalar, kolostrum yerine geçen bazı ticari ürünlerle beslenmenin daha başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir (34). Ayrıca kolostrumla beslenmeyen buzağların beslenenlere göre daha erken zamanda IgG ve IgA üretimini tetikledikleri saptanmıştır. Peynir altı suyu, kan/serum, normal süt ve yumurtadan elde edilen ticari olarak kurutulmuş kolostrum ek/ikame ürünleri olarak kolostrumun yerine kullanılabilir. Bu ürünler maternal kolostrumla birlikte buzağda istenilen düzeyde antikör sağlayarak pasif transferin desteklenmesi ve kolostrumdan patojenlerin bulaşma riskinin azaltılması amacıyla kullanılması durumunda başarılı sonuçlar alınabildiği tespit edilmiştir. Kolostrum yerine geçen bu ek ikame ürünleri kolostrumla kıyaslandığında avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Üretilmiş kolostral immunoglobulinler, çeşitli mekanizmalar tarafından yenidoğan immunitisini baskılayabilir. İmmün sistemin kolostral türevli immunoglobulinler tarafından baskılanması mekanizması, antijene özgü olabilir veya antijene özgü olmayabilir (27). Bu ürünlerde IgG seviyelerinin maternal kolostruma

oranla daha sınırlı elde edilebilmesi ve lezzetlerinin de iyi olmaması olumsuz yanlarını oluşturmaktadır. Kolostrumun dışındaki kaynaklardan hazırlanan ek/ikame ürünlerde tripsin inhibitörleri yüksek oranda bulunmayabilir. Bu nedenle bu ürünlerdeki IgG'ler proteolitik bozulmaya ve yetersiz absorpsiyona daha duyarlı olabilir (14). Rotavirüs veya *EPEC* suşlarının neden olduğu ishaller hastalıkları önlemek için yenidoğan yavrularda kolostral peynir altı suyu bazlı veya normal peynir altı suyu bazlı çeşitli antikor preparatları yem takviyeleri veya kolostrum ikameleri olarak kullanılabilir. Kolostrumdan yapılmış immunoglobulin preparatları bağışıklık sütü olarak adlandırılmaktadır (36). Tipik bir bağışıklık sütü suda çözülebilen susuzlaştırılmış peynir altı suyu tozu, yağsız süt, bazı immunoglobülinler ve total protein içeriğinin %30-50'si olarak formüle edilebilir. Bir immun süt preparatı olan ticari bağışıklık süt ürünleri *rotavirüs*lere karşı aktif dondurulmuş ve liyofilize sığırların antimikrobiyal etkisinin buzağlar üzerinde kolostrumdan farklı olmadığı gösterilmiştir (4). Son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışmada sığır hiperimmün kolostrum preparatının oral uygulamasının insanlarda ve hayvanlarda birçok bulaşıcı madde ve hastalıklara karşı etkili koruma sağladığı bildirilmiştir (34). Ayrıca yeni doğan buzağlara kolostrum yerine intravenöz olarak verilen plazma uygulamasının kolostrum veya kolostrum replasmanı verilen buzağlara göre, immunoglobulinlerin yeterli oranda transferinin yapılamadığı ve ölüm oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (27). Kolostrum yerine geçebilen ikame maddelerin avantaj ve dezavantajları aşağıdaki şekilde özetlenir (37):

Kolostrum İkame Ürünün Avantajları

- Hazır ve uygun şekilde paketlenmiş ve kullanıma hazır,
- 2 litre suda karışım kolaylığı
- Bakteriyel kontaminasyon veya bulaşıcı hastalık transferi yok,

- Yeterli immunoglobulin seviyeleri elde edilebilir,
- Buzağı sağlığı tehlikeye girmez.

Kolostrum ikame ürünün dezavantajları

- İmmünglobulin düzeyleri kolostrumdan daha düşük,
- Ürünün besin takviyesi eklenmiş olmasına rağmen, kolostrum kadar besleyici değil,
- Spesifik olmayan bağışıklık faktörleri ve bağışıklık hücreleri mevcut değildir,
- Yüksek karbonhidrat içeriği, özellikle kolostrum ile karıştırıldığında hızlı mide boşalmasına neden olabilir. Bu durum enterotoksemi riskini artırabilir.

6. Neonatal Buzağlarda Görülen Hastalıkların Kolostrumla İlişkisi

Neonatal dönemde buzağlarda %20'lik bir kayıp hayvancılık sektöründe %40'lık bir kar kaybına neden olur. Bu dönemdeki buzağı ölümlerine neden olan faktörler, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenler olarak iki kısımda incelenebilir (1).

7. Enfeksiyöz Nedenler

Neonatal dönemde buzağlarda verim ve ölüm kayıplarında gastrointestinal ve solunum sistemi hastalıkları önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu dönem aralığındaki buzağların gastrointestinal hastalıklarından ishaller neden olan hastalıklar ve solunum sistemi hastalıkları olarak pnömonilere neden olan hastalıklar önemli rol oynamaktadır (38). İmmünglobulinler virüsler, protozoalar, bakteriler ve toksinler gibi belirli antijenleri spesifik olarak tanıyan ve bunlara bağlanan immun tepkinin önemli bir parçası olarak işlev gören plazma hücreleri tarafından üretilen glikoprotein molekülleridir (39). Buzağı yetiştiriciliğinin en kritik dönemi, yüksek hastalık ve ölüm riski nedeniyle yaşamın ilk ayıdır (12, 40). İshal yenidoğan buzağlarda önemli bir hastalıktır ve hem sütçü hem de etçi buzağılardaki ekonomik kayıpların en önemli nedenidir (12,40). Yenidoğan buzağlarda; *rotavirüs*, *coronavirüs*, *Enteropatojenik*

E. coli, *Salmonella* türleri ve kriptosporidyumlar başlıca enfeksiyöz ajanlardır (40,41). Hastalığın insidansı ve ciddiyeti, bir buzağının aldığı kolostrum miktarına ve IgG seviyesine oldukça bağlıdır (12). Neonatal buzağı pnömonilerin etiolojilerinde rol olan bakteriyel etkenler; *Pasteurella multocida*, *Pasteurella hemolytica*, *Streptococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma bovis*, *Corynaebacterium pyogenes* ve *E. coli*'dir (40). Viral etkenler ise; *Herpesvirus*, *Pestivirüs*, *Coronavirus*, *Adenovirüs*, *BHV-1*, *Reovirüs*, *Rinovirüs* ve *Parainfluenza-3 (P1-3)* virüslerdir (1).

Hayvanlarda düşük Ig konsantrasyonları ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için pek çok çalışma yürütülmüştür (12,32). İmmünoglobulinler; pnömonik patojenlerin tanımlanması, nötralizasyonu, opsonizasyonu ve doğrudan parçalanmasında özellikle etkili olduğu bildirilmiştir (42). Buzağlarda yaşamın ilk haftalarında yetersiz kolostrum alımına bağlı oluşan yetersiz immuniteden dolayı solunum yolu enfeksiyonlarına duyarlılığın ve ölüm riskinin arttığı saptanmıştır (12).

Tablo 3. Farklı hastalıklara sahip buzağlar arasındaki serum total protein ve IgG'nin karşılaştırılması (42).

Table 3. Comparison of serum total protein and IgG between calves with different morbidity (42).

Parametre	Total Protein g/dl	Ortalama	Ig G g/dl	Dağılım aralığı
Sağlıklı Buzağı	6.42 ± 0.62	5.2-7.3	3.904 ± 0.61	2.950–5.000
İshalli Buzağı	6.33 ± 0.69	4.9–8.0	3.561 ± 0.83	2.000–5.000
Pnömonili Buzağı	6.40 ± 0.63	5.6–8.0	3.547 ± 0.80	2.100–5.000
Pnömoni + İshalli Buzağı	6.45 ± 0.59	5.5–7.5	3.770 ± 0.74	2.600–5.000

8. Enfeksiyon Olmayan Sebepler

8.1. Doğum Dönemi

Mevsimler ile yavru ölümleri arasında bir ilişkinin olduğu, kış aylarında kolostrum immünoglobulin konsantrasyonlarının ilkbahar ve yaz aylarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Kış aylarında ölüm oranı %69.6, ilkbahar ve yaz aylarında ise %5.97 düzeyinde saptanmıştır (8,12).

8.2. Doğum ve Doğumsal Problemler

Gebe ineklerde distosi (güç doğum) yenidoğanlarda ölüm oranını artırır. Bunun yanısıra cinsiyet (erkek) ve doğum ağırlığı buzağlarda ölü doğum oranını artıran diğer önemli faktörlerdir (8).

9. Barınma ve Bakım

Buzağı barınaklarının; yetersiz havalandırma koşulları, birim alandaki aşırı hayvan yoğunluğu, temizlik ve dezenfeksiyon yetersizlikleri yüksek buzağı ölümlerine yol açan solunum sistemi rahatsızlıklarının önemli nedenleridir. Hayvan bakıcıları buzağların yaşamının ilk 6-8 saatinde

maksimum düzeyde kolostrum almalarını sağlamalıdır (8). Eğer bu süre içinde buzağının kolostrumla beslenmesi ertelenirse, buzağlarda hipo veya agamaglobülinemi gelişir (12). Emzirme uygulaması biberonla beslenme ile kıyaslandığında, kolostral immünoglobulin emiliminin daha yüksek olduğu ve bu nedenle, buzağının annesini doğumdan sonraki ilk iki gün emiliminin sağlanması tavsiye edilmektedir (8).

SONUÇ

Buzağı yetiştiriciliğinde neonatal dönem oldukça önem bir periyottur. Buzağı yönetimi uygulamalarında büyük gelişmeler olmasına rağmen, neonatal dönemde buzağların hastalıklara yakalanma riski ve mortalite oranının %9 civarında olduğu rapor edilmektedir. Neonatal dönemdeki gerek buzağı ölümleri ve gerekse buzağlardaki verim kayıplarına bağlı oluşan ekonomik kayıplar hayvancılık sektöründe önemli yer teşkil etmektedir. Bu dönemde yenidoğan buzağları hastalıklara karşı korumak ve yaşam sürecinde etkin bir canlı ağırlık artışının sağlanması için kolostrum veya kolostrum

ikame besinleri buzağlara zamanında ve yeterli miktarda verilmesi önemlidir.

Çıkar Çatışması

Bu derlemede yazarlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

KAYNAKLAR

- Singh DD., Kumar M., Choudhary PK., Singh HN., 2009. Neonatal calf mortality an overview. *Intas Polivet*, 10, 165-169.
- Piccione G., Casella S., Pennisi P., Giannetto C., Costa A., Caola G., 2010. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 62, 1-12.
- Korhonen H., Marnila P., Gill HS., 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr*, 84, 75-80.
- Lilius EM., Marnila P., 2001. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections. *Curr Opin Infect Dis*, 14, 295-300.
- Diesch TJ., Mellor DJ., Stafford KJ., Ward RN., 2004. The physiological and physical status of single calves at birth in a dairy herd in New Zealand. *N Z Vet J*, 52, 250-255.
- Baumrucker CR., Burkett AM., Magliaro-Macrina AL., Dechow CD., 2010. Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *J Dairy Sci*, 93, 3031-3038.
- Struff WG., Sprotte G., 2007. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: review. *Int J Clin Pharmacol Therapeut*, 45, 193-202.
- Kozat S., 2018. Hypothermia in newborn calves. *J Ist Vet Sci*, 2, 30-37.
- Sherwin V., Hudson C., Henderson A., Breen J., 2016. Measuring health and performance in preweaning dairy calves. *In Practice*, 38, 113-122.
- Johnson JL., Godden SM., Molitor T., Ames T., Hagman D., 2007. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci*, 90, 5189-5198.
- Conneely M., Berry DP., Sayers R., Murphy JP., Lorenz I., Doherty ML., Kennedy E., 2013. Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows. *Animal*, 7, 1824-1832.
- Gökçe E., Erdoğan HM., 2013. Neonatal buzağlarda kolostral immunoglobulinlerin pasif transferi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 4, 18-46.
- Miyazaki T., Okada K., Miyazaki M., 2017. Neonatal calves coagulate first-milking colostrum and produce a large curd for efficient absorption of immunoglobulins after first ingestion. *J Dairy Sci*, 100, 7262-7270.
- Weaver DM., Tyler JW., Van Metre DC., Hostetler DE., Barrington GM., 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J Vet Intern Med*, 14, 569-577.
- Godden S., 2008. Colostrum management for dairy calves. *North Am Food Anim Pract*, 24, 19-39.
- Nagy DW., 2009. Resuscitation and critical care of neonatal calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 25, 1-11.
- Godson DL., Acres SD., Haines DM., 2003. Failure of passive transfer and effective colostrum management in calves. *Large Anim Vet Rounds*, 3, 1-6.
- Korhonen H., Marnila P., Gill HS., 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr*, 84, 75-80.
- Chigerwe M., Tyler JW., 2010. Serum IgG concentrations after intravenous serum transfusion in a randomized clinical trial in dairy calves with inadequate transfer of colostral immunoglobulins. *J Vet Intern Med*, 24, 231-234.
- Blum JW., Hammon H., 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livest Sci*, 66, 151-159.
- Hurley WL., Theil PK., 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3, 442-474.
- Lakritz J., Tyler JW., Hostetler DE., Marsh AE.,

- Weaver DM., Holle JM., Denbigh JL., 2000. Effects of pasteurization of colostrum on subsequent serum lactoferrin concentration and neutrophil superoxide production in calves. *Am J Vet Res*, 61, 1021-1025.
23. Furman-Fratczak K., Rzasa A., Stefaniak T., 2011. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. *J Dairy Sci*, 94, 5536-5543.
24. Saif LJ., Smith KL., Landmeier BJ., Bohl EH., Theil KW., Todhunter DA., 1984. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. *Am J Vet Res*, 45, 49-58.
25. Lemaire M., Weynants V., Godfroid J., Schynts F., Meyer G., Letesson JJ., Thiry E., 2000. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol*, 38, 1885-1894.
26. Sangild PT., 2003. Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Vet Scand*, 44, 105-122.
27. Murphy JM., Hagey JV., Chigerwe M., 2014. Comparison of serum immunoglobulin G half-life in dairy calves fed colostrum, colostrum replacer or administered with intravenous bovine plasma. *Vet Immunol Immunopathol*, 158, 233-237.
28. Quigley J., Hammer CJ., Russel LE., Polo J., 2002. Passive immunity in newborn calves. *Advances Dairy Tech*, 14, 273-292.
29. Güngör Ö., 2006. Newborn calves and colostrum. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12, 103-108.
30. Atkinson DJ., Von Keyserlingk MAG., Weary DM., 2017. Benchmarking passive transfer of immunity and growth in dairy calves. *J Dairy Sci*, 100, 3773-3782.
31. Beam AL., Lombard JE., Koprak CA., Garber LP., Winter AL., Hicks JA., Schlater JL., 2009. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *J Dairy Sci*, 92, 3973-3980.
32. Pardon B., Alliet J., Boone R., Roelandt S., Valgaeren B., Deprez P., 2015. Prediction of respiratory disease and diarrhea in veal calves based on immunoglobulin levels and the serostatus for respiratory pathogens measured at arrival. *Prev Vet Med*, 120, 169-176.
33. Panousis N., Kritsepi-Konstantinou M., Kalaitzakis E., Giadinis N., Valergakis GE., 2013. Prevalence of failure of passive transfer of immunoglobulins in Holstein calves in Northern Greece and association with management practices. *J Hellenic Vet Med Soc*, 64, 193-200.
34. Lago A., Socha M., Geiger A., Cook D., Silva-del-Rio N., Blanc C., Leonardi C., 2018. Efficacy of colostrum replacer versus maternal colostrum on immunological status, health, and growth of preweaned dairy calves. *J Dairy Sci*, 101, 1344-1354.
35. Morrill KM., Conrad E., Polo J., Lago A., Campbell J., Quigley J., Tyler H., 2012. Estimate of colostral immunoglobulin G concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. *J Dairy Sci*, 95, 3987-3996.
36. Hilpert H., Brussow H., Mietens C., Sidoti J., Lerner L., Werchau H., 1987. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J Infect Dis*, 156, 158-166.
37. McQuirk SM., 2003. Solving calf morbidity and mortality problems. In *American Association of Bovine Practitioners, 36th Annual Conference*.
38. Windeyer MC., Leslie KE., Godden SM., Hodgins DC., Lissemore KD., LeBlanc SJ., 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev Vet Med*, 113, 231-240.
39. Pagnoncelli MG., De Melo Pereira GV., Fernandes MJ., Tanobe VO., Soccol CR., 2017. Milk Immunoglobulins and Their Implications for Health Promotion. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease Academic Press*. pp. 87-96.

40. Kozat S., 2000. İshalli buzağıllarda Kristalloid (Laktatlı Ringer) ve Kolloid+Kristalloid (%6 Dekstran + Laktatlı Ringer) infuzyon solüsyonlarının rehidratasyon etkinliği. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
41. Tuncay I., Kozat S., 2018. Prevalence of Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium spp., Escherichia coli K 99, and Giardia lamblia pathogens in neonatal calves with diarrheic in Siirt Region of Turkey. Van Vet J, 29, 17-22.
42. Villarroel A., Miller TB., Johnson ED., Noyes KR., Ward JK., 2013. Factors affecting serum total protein and immunoglobulin G concentration in replacement dairy calves. Adv Dairy Res, 1, 1-5.



İneklerde Anöstrus: Nedenleri ve Sınıflandırılması

Damla Tuğçe OKUR^{1a}, Bülent POLAT^{1b}✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-2733-2155^a, 0000-0002-1790-6808^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
01.04.2019	03.07.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Okur DT, Polat B: İneklerde Anöstrus: Nedenleri ve Sınıflandırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,14(3): 354-361, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.547777.

Öz: Hayvancılık işletmelerinin devamlılığı için verimlilik esastır. İşletmelerde verimliliğin sağlanması, ideal fertilité parametrelerinin gerçekleştirilebilmesine bağlıdır. İnfertilite; istenilen sürede yavru alınamaması, süt üretiminin düşmesi, verim alınamayan hayvanların gereksiz beslenmesi, sürüden çıkarılması, iş gücü, sperma ve ilaç gibi fazladan yapılan harcamalar sonucu işletmelerde önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle tüm hayvancılık işletmelerinde hayvanların dölvörimini optimum düzeyde tutmaya çalışmak öncelikli hedefdir. Sığır yetiştiriciliği yapılan büyük işletmelerde bu hedefe ulaşılmasını zorlaştıran faktörlerden bir tanesi de anöstrus problemidir. Anöstrus, hayvancılık işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan ve sürekli göz ardı edilen bir üreme problemidir. Anöstrus, postpartum süreyi uzatmasının yanı sıra yıl içinde doğan buzağı sayısının azalmasına, et ve süt satışından elde edilen gelirin düşmesine neden olur. İneklerde infertilitenin başlıca nedenlerinden biri olan anöstrusa; yetersiz beslenme, çevresel faktörler, ovaryum ve uterus patolojileri ile yönetimsel eksiklikler veya hatalar gibi birçok faktör neden olmaktadır. Anöstrusun doğru bir şekilde tanımlanması ve nedenlerine yönelik çözümlerin bulunması sığırçılık işletmelerinde verimlilik açısından hayati öneme sahiptir. Sunulan bu derlemede ise, ineklerde anöstrusa neden olan faktörler ile fizyolojik ve patolojik anöstrusun sınıflandırılmasına değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anöstrus, İnek, Nedenler, Sınıflandırma.

Anoestrus in Cows: Causes and Classification

Abstract: Efficiency is essential for the continuity of livestock enterprises. Ensuring productivity in the enterprises depends on the realization of ideal fertility parameters. Infertility can cause significant economic losses in enterprises because of inefficiency of fry in the desired time, decrease in milk production, unnecessary feeding of ineffective animals, removal from the herd, labor, extra expenses such as semen and medicine. Therefore, it is a primary objective to try to keep the fertility of animals at an optimum level in all livestock enterprises. Anoestrus problem is one of the factors that make it difficult to reach this target in large cattle breeding companies. Anoestrus is a reproductive problem, which is continuously ignored and causes serious economic losses in livestock enterprises. In addition to prolonging the postpartum period, anoestrus causes a decrease in the number of calves born during the year and a decrease in the income obtained from the sale of meat and milk. Anoestrus, one of the main causes of infertility in cows; malnutrition, environmental factors, ovarian and uterine pathologies and managerial deficiencies or errors. Accurate identification of anestrus and finding solutions to its causes is vital for productivity in cattle holdings. In this review, the factors that cause anoestrus in cows and the classification of physiological and pathological anoestrus are discussed.

Keywords: Anoestrus, Causes, Classification, Cow.

✉Bülent Polat

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: bpolat@atauni.edu.tr

GİRİŞ

İneklerde anöstrus, sütçü veya etçi hayvanların kızgınlık takibinin aktif bir şekilde yapılmasına rağmen, kızgınlık belirtilerinin görülmemesidir (1-3). İnfertilitenin en yaygın nedenlerinden biri olan anöstrus, sığırlarda buzağılama aralığının uzamasına yol açarak işletmeler için büyük ekonomik kayıplara neden olur (4,5). Anöstrus hipotalamus ve hipofizin baskılanarak gonadotropin sekresyonu üzerinde negatif etki oluşturmasıyla gerçekleşir. Postpartum dönemde dolaşımdaki LH yeterli seviyelere ulaşmadığında, ovulasyon gerçekleşemez. Bunun yanı sıra folikül ovulasyonu için, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) gibi birçok intraovarian bileşenlere de ihtiyaç vardır. Sonuç olarak yetersiz LH salınımı, düşük seviyedeki insülin ve IGF-I gibi faktörler foliküler büyümeyi engelleyerek ovulasyon şansını azaltmaktadır (6). Bu patolojinin oluşumundaki temel nedenlerden biri; yetersiz beslenmeye bağlı oluşan negatif enerji dengesi (NED) problemi (7). Hayvanlarda meydana gelen NED, vücut rezervlerinin kullanılmasına bağlı olarak endojen opioidlerin açığa çıkmasına neden olur. Bunun sonucunda esterleşmemiş yağ asidinin (NEFA) dolaşımdaki konsantrasyonu artar. Dolaşımdaki NEFA'nın artışı LH'nin salınım sıklığını azaltarak ovulasyon mekanizmasında aksamalara yol açar. NED'in yanı sıra, laktasyon, emzirme ve strese bağlı olarak salgılanan prolaktin, oksitosin, kortizol gibi hormonlar da LH salınım sıklığını azaltarak ovulasyonu engeller. Tüm bu patolojik olaylar sonucunda dolaşımdaki LH konsantrasyonu istenilen düzeylere yükselmez böylece ovulasyon gerçekleşmeden folikül atretik hale gelerek regrese olur. Bu süreç, fizyolojik sınırlar içerisinde olması gereken anöstrus süresinin uzamasına neden olur (2). Sütçü sığırlarda postpartum ilk 63 gün içerisinde yaklaşık %35 oranında anöstrus gözlemlenir (8).

1. Anöstrüse Neden Olan Faktörler

1.1. Emzirme

Emzirme, doğum sonrası ovaryum aktivitesinin geç başlamasına, dolayısıyla da postpartum anöstrus süresinin uzamasına neden olan önemli faktörlerden birisidir (3). Prolaktin, oksitosin ve kortizol gibi GnRH-LH salınımını negatif etkileyen hormonlar, emzirmenin LH üzerindeki baskılayıcı mekanizmanın sorumlusudur. Bu hormonların kanda yüksek seviyelere ulaşması, β -endorfin gibi endojen opioid peptidlerin salınımını uyarır (2). Merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapan bu opioidler, GnRH'nin dolayısıyla LH'nin salınım sıklığının azalmasına neden olurlar. Pulsatil LH salınımının azalması, folikülün preovulasyon aşamaya ulaşmasını engelleyerek doğumdan sonraki ilk ovulasyonun gecikmesine dolayısıyla da postpartum anöstrus süresinin uzamasına neden olur (9).

1.2. Genotip ve Parite

Postpartum siklik aktivitenin tekrar başlama süresi ırk özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Postpartum anöstrus süresi sağlan sütçü ineklere kıyasla, emziren etçi ineklerde daha uzundur (2,3). Parite, anöstrus için bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (10). İlk doğumunu yapan ineklerde postpartum ilk ovulasyonun gecikmesi nedeniyle anöstrus görülme ihtimali artarken, özellikle dört veya dörtten fazla buzağılayan multipar ineklerde luteal dönemin uzaması nedeniyle anöstrus görülme ihtimali artmaktadır (9). Doğum sayısının artması ile uterusun involüsyon sürecinin uzadığı, kalıcı korpus luteum (KL) ve/veya piyometra riskinin daha yüksek olması sonucunda luteal dönemin uzadığı ve buna bağlı olarak anöstrus görülme sıklığının artabileceği de bildirilmiştir. Fakat Holştayn ırkı ineklerde yapılan bir çalışmada ilk defa doğuran ineklerdeki buzağılama-ovulasyon aralığı ve ilk ovulasyona kadarki foliküler dalga sayısının, birden fazla doğum yapmış olanlardan daha fazla olduğu bildirilmektedir (11). Genç hayvanlarda siklik aktivitedeki bu

gecikmenin, ilk doğumu takiben vücut gelişiminin devam etmesine bağlı olduğu sanılmaktadır (12).

1.3. Uterus İnvölüsyonu

Peripartum dönemde güç doğum, retensiyon, sekondinarum, hipokalsemi, ketozis, ikizlik, yavru zarlarının hidropsu ve uterus enfeksiyonu gibi sorunlar, uterus involüsyonunun gecikmesine neden olur (3). Yapılan bir çalışmaya göre ise yüksek süt veriminin uterus involüsyonunun gecikmesine neden olduğuda bildirilmiştir (13). Postpartum ovaryum aktivitesinin gecikmesi sonucu, fizyolojik postpartum anöstrus dönemi dolayısıyla ilk ovulasyonun görülme süresi uzar (3).

1.4. Yüksek Süt Verimi

Sütçü ineklerde, süt verimi ile buzağılama sonrası sıklık aktivitenin yeniden başlaması arasında sıkı bir ilişki vardır. Son elli yıl içinde birim başına elde edilen süt verimi büyük oranda artmıştır (14). Yüksek süt verimli ineklerde doğum sonrası görülen ilk östrus, ovulasyon zamanı ve dolayısıyla buzağılamatohumlama aralığı uzamaktadır. Örneğin; 305 günlük laktasyon süresince 9.000 kg süt veren ineklerde postpartum ilk östrus ortalama 54. günde şekillenirken, 12.000 kg süt verenlerde ise bu süre ortalama 72. gündür (15). Özellikle erken postpartum dönemde, sütçü ineklerde yüksek süt verimi nedeniyle enerji açığı ortaya çıkmaktadır. Yeterli miktarda gıda alınamaması durumunda inekler bu açığı karşılamak için vücuttan öncelikle yağ, bazen de proteinleri hızla mobilize etmek zorunda kalır. Mobilizasyon sonucunda kandaki NEFA, β -hidroksi butirat, triaçilgliserol düzeyi artarken, insülin, glikoz ve IGF-1 düzeyi azalır. Tüm bu metabolik değişimler sonucunda ovulasyon dinamiği olumsuz etkilenir ve postpartum anöstrus süresi uzar (16).

1.5. Beslenme

Beslenme ineklerde üremeyi etkileyen önemli faktörlerden birisidir (17). İnfertilite probleminde etkili olan faktörlerin başında gebeliğin son döneminde başlayan ve laktasyonun erken

döneminde şiddetlenen NED gelmektedir (18,19). Sütçü ineklerde süt verimi doğumdan sonraki 3-8. haftalarda en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Buna karşılık yüksek süt verimine sahip ineklerin, doğum yaptıktan sonra kuru madde alımlarındaki artış, laktasyon için gerekli olan besin ihtiyaçlarındaki artış kadar hızlı gerçekleşmeyip yaklaşık 12-16. haftadan sonra yükselmektedir. Bir başka deyişle süt inekleri yüksek düzeyde enerji ve besin maddelerine gereksinim duyduğu günlerde bu materyalleri sağlayacak kadar kuru madde tüketmemektedir. Yetersiz kuru madde tüketimi sonucunda oluşan NED, LH salınımını baskılamaktadır. Pulsatil LH salınımı için östrodiolun hipotalamus ve hipofiz üzerine pozitif feedback etkisinin oluşması gerekir. Fakat bu etki beslenmeye bağlı olarak özellikle erken postpartum dönemde baskı altına alınır (20). Yetersiz beslenme sonucu insülin benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini (IGF-1 BPs), insülin miktarı ve LH'ya karşı foliküler cevabın azalması sonucu östradiol üretiminde azalma şekillenir (17). NED olan sütçü sığırlarda kandaki insülin ve IGF-1 düşük seviyelerdedir. İnsülin ve IGF-1 ovaryum hücreleri üzerinde doğrudan uyarıcı etkiye sahip olup, ovaryumdaki foliküllerin gelişimiyle direkt olarak ilişkilidir (21). Dolaşımdaki düşük IGF-1 konsantrasyonu büyüme hormonunun (GH) üzerindeki negatif feedback etkiyi azaltır ve dolaşımdaki GH konsantrasyonunun artmasına yol açar. Artan GH konsantrasyonu karaciğer glikoneogenezini artırır ve lipolizi teşvik ederek, NEFA salınmasına neden olur. GH ve NEFA konsantrasyonlarının yüksek düzeyde seyretmesi postpartum sütçü ineklerde insülin direnci oluşturur. Dolaşımdaki düşük insülin, IGF-1 ve glikoz seviyeleri dominant folikülden östrojen üretimini kısıtlayarak LH'nın pulsatil salınımını baskılar. Bunun sonucunda da ovulasyon mekanizmasında aksamalar görülür (22).

1.6. Vücut Kondisyon Skoru

Vücut kondisyon skoru (VKS), ineklerin metabolizması için sağlanabilir enerji rezervini ve

beslenme durumunu yansıtır. Süt ineklerinin buzağılama sırasında sahip oldukları VKS'nin beslenme, üretim ve sağlık arasındaki dengeyi sağlamak açısından oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Sütçü ineklerin VKS'lerinin buzağılama döneminde 2.75-3 (5 puanlık VKS skalası) civarında olması ve buzağılama ile ilk tohumlama sürecindeki kaybın 0.5 puandan daha az olması istenir. Eğer VKS kaybı >1 puan olursa, doğumdan ilk ovulasyona kadar geçen sürenin uzayacağı ifade edilmektedir (16). Hayvanlarda bir puandan fazla VKS kaybı oluşması durumunda; uterus involusyonunun geciktiği, lüteal aktivitenin geç başladığı, postpartum gerçek anöstrüs süresinin uzadığı, ilk tohumlamada gebelik oranının düştüğü, reproduktif hastalıkların görülme oranının arttığı ve gebe kalma oranının azaldığı gözlemlenmiştir (18). Doğum sonrası dönemde 1 puandan fazla VKS kaybeden ineklerde, 0.5 puan kaybedenlere göre; ilk ovulasyonun 15 gün daha geç şekillendiği ve her 0.5 puanlık kayıp sonucu gebelik oranının %10-15 kadar azaldığı bildirilmiştir (18).

1.7. Mevsim

Kış aylarında buzağılayan ineklerin, yaz aylarında buzağılayan ineklere göre buzağılama sonrası ilk östrusun görülme süresi daha uzundur. Fotoperiyot, postpartum siklik aktivitenin düzenlenmesinde önemli rol oynar (23). Fotoperiyodun kışalmasına bağlı olarak GnRH salınımı baskılanmakta ve fizyolojik postpartum süreci uzamaktadır (24). Yüksek sıcaklık (>30 °C) ve nem üreme performansını olumsuz etkiler. Yüksek sıcaklığa maruz kalan ineklerde östrusun dış belirtileri belirgin değildir ve östrus süresi kısadır. Nitekim yaz mevsiminde doğal aşımın yapıldığı sürülerde 4.5 aşım hareketi gözlemlenirken, kış mevsiminde östrus başına ortalama 8.6 aşım hareketinin gözlemlendiği ve östrus belirleme oranlarının yaz mevsiminde %76-82 iken, kış mevsiminde %44-65'e düştüğü bildirilmiştir. Sıcaklık östrus döneminde üreme hormonlarının sentezini baskılar. Ayrıca sıcaklığa bağlı oluşan stres nedeniyle kortizol salınımı artar.

Dolaşımdaki kortizol seviyesinin artması, östradiolün indüklediği seksüel davranışların belirgin hale gelmesini engeller (18).

1.8. Stres

Korku, açlık, ağrı ve aşırı soğuk veya sıcak hava, hayvanların fizyolojik ve psikolojik fonksiyonları üzerinde olumsuz etki oluştururlar. Stres nedeniyle hipotalamustan kortikotropik hormon salgılanır ve hipofizden proopiomelanokortin salınımına neden olur. Proopiomelanokortin adrenokortikotropik hormon vasıtasıyla kortizon ve opioidlerin salınımını artırır, GnRH dolayısıyla da FSH ve LH salınımı baskılar, buna bağlı olarak hayvanlarda siklik aktivitenin başlama süresi uzar (25).

1.9. Uterus Enfeksiyonları

Postpartum süreçte uterustaki fırsatçı patojenlerin varlığı sonucu gelişen uterus enfeksiyonları ovaryum dinamiğini etkiler (16). Uterus enfeksiyonunun varlığı geçici FSH yükselmesini ve foliküler dalganın ortaya çıkışını etkilemezken, dominant folikülün gelişimini yavaşlatır. Bu durumda dominant folikül daha az östrojen üretir, LH piki gecikir ve buzağılama ilk ovulasyon aralığı uzar. Folikül gelişimi ve ovulasyon üzerine olan bu etkiler, çoğu zaman enfeksiyona yol açan bakterilerin ürettiği endotoksinler veya yangıyla ilişkili açığa çıkan mediyatörler aracılığıyla doğrudan LH sekresyonunun etkilenmesi şeklinde gerçekleşmektedir (16). Lipopolisakkarid (LPS) ve tümör nekrozis faktör α 'nın (TNF α) ovaryum hücre fonksiyonlarını baskıladığı; LPS'nin granuloza hücrelerinde östradiol sekresyonunu azalttığı, TNF α 'nın teka hücrelerinden androstenedion, granuloza hücrelerinden östradiol üretimini azalttığı belirlenmiştir (26).

2. Anöstrusun Sınıflandırılması

2.1. Fizyolojik Anöstrus

Hayvanlarda pubertas öncesi, gebelik, laktasyon ve erken postpartum dönem gibi bazı fizyolojik dönemlerde östrus gözlenmez. İnfertiliteyle ilişkili

olmayan bu duruma fizyolojik anöstrus denir. Fizyolojik anöstrus; pre-pubertal, gebelik, laktasyon ve postpartum anöstrus olarak üzere 4 grupta sınıflandırılır (2).

2.1.1. Pre-pubertal Anöstrus

Pre-pubertal dönemde olan düvelerdeki foliküler dalga yetişkin hayvanlarınkine benzerdir. Fakat foliküller sadece FSH hormonu etkisi altında büyür ve daha sonra atreziye olurlar. Pre-pubertal anöstrus, yetersiz foliküler büyümeyle sonuçlanan LH salınım sıklığındaki yetersizlik sonucu şekillenir (2).

2.1.2. Gebelik Anöstrusu

İneklerde gebelik nedeniyle siklusun bölünmesi fizyolojik bir durumdur (9). Gebelik boyunca artan progesteron konsantrasyonu, hipotalamustan GnRH sekresyonu üzerine negatif feedback etki göstererek, LH salınımını baskılar. Böylece hayvanlarda gebelik boyunca fizyolojik anöstrus şekillenir (2).

2.1.3. Laktasyonel Anöstrus

Çiftlik hayvanlarında yüksek süt verimi, infertilite nedenlerinden biridir. Laktasyon döneminde yüksek süt verimli hayvanların dolaşımında artan prolaktin seviyesi, GnRH sekresyonunu baskılar. Baskılanan GnRH sekresyonu hipofizden salgılanan FSH ve LH salınımını engeller. Bu durum hayvanlarda anöstrusa neden olur (2).

2.1.4. Postpartum Anöstrus

Postpartum anöstrus, buzağılama sonrası kısa bir süreliğine östrus belirtilerinin görülmemesi olarak tanımlanır (27,28). Çiftlik hayvanları ise, gebeliği takiben postpartum anöstrus olarak adlandırılan kısa süreli bir döneme girerler (2). Adenohipofiz gebelik boyunca plasenta ve KL'den salgılanan progesteronun negatif feedback etkisi altındadır. Adenohipofiz gebelik boyunca uzun bir süre baskılandığı için doğum sonrası 8-10 gün boyunca GnRH'ya cevap veremez ve bunun sonucunda da gonadotropinlerin yetersiz salgılanması veya hiç

salgılanmamasına bağlı olarak inekler bir süreliğine fizyolojik anöstrusa girerler (24).

2.2. Patolojik Anöstrus

Ovaryum agenezisi, disgenezisi veya foliküler-luteal dinamiğin bozulması gibi bazı patolojik durumlar, infertiliteye yol açarak sürü problemlerine neden olur. Bu sorunlar konjenital veya edinsel olarak iki gruba ayrılır (2).

2.2.1. Anöstrusun Konjenital Nedenleri

Ovaryum agenezisi ve disgenezisi kongenital anöstrusun başlıca sebeplerindedir. Ovaryum agenezisi ya da aplazisi ovaryumların birinin ya da her ikisinin bulunmaması ile karakterizedir. Bilateral aplastik düvelerin çiftleşme yaşına kadar normal düvelerden bir farkı yoktur, fakat pubertarla birlikte östrus göstermedikleri fark edilir (2). Ovaryum disgenezisi ya da ovaryum hipoplazisi ise ovaryumun gelişimini tamamlamaması olarak tanımlanır. Tek veya çift taraflı şekillenebilir. Çift taraflı tam hipoplastik dişiler anöstrus gösterirken, kısmi hipoplastik hayvanlar östrus gösterebilir, çiftleşebilir ve buzağı doğurabilir (29). İneklerde ikiz gebelik şekillendiğinde yavrulardan biri erkek diğeri dişi olursa fetüslerin allontois damarlarında anastomoz şekillenebilir. Bunun sonucunda da dişi yavrunun üreme organlarında gelişme bozuklukları meydana gelir. Bu durum freemartinizm olarak tanımlanır. Freemartin düvelerin ovaryumları hipoplazik olduğu için bu tür hayvanlar anöstrus gösterirler (12).

2.2.2. Edinsel Ovulatör Anöstrus

2.2.2.1. Suböstrus

Suböstrus, klinik olarak östrus belirtilerinin gözlemlenmemesi olarak tanımlanır (2). Suböstrus, sakın östrus ya da yetiştiriciler tarafından gözlemlenmeyen östrus olarak da tanımlanabilir (3). Bu tip östrusta foliküler gelişim ve ovulasyon, östrus belirtileri göstermeksizin oluşur. Ovulasyon ve ardından KL şekillenir. Bu tür ineklerin ovaryumları aktif olup, düzenli siklik aktivite gösterirler. Ancak östrusun dış belirtilerini göstermezler ya da

gösterdikleri belirtiler hayvan bakıcıları tarafından belirlenemeyebilir (2).

2.2.3. Edinsel Anovulatör Anöstrus

2.2.3.1. Anovulatör Anöstrus Tip-I

Bu tip anöstrusta foliküller, folikül havuzundan çıkarak büyüme sürecine girer ve büyüyen foliküllerin çapı en fazla 4 mm'ye ulaşabilir. Gelişen foliküllerden herhangi biri deviasyon noktasına ulaşmadığı için dominant folikül haline gelemmez. Bu tip anöstrus görülen hayvanlarda yapılan rektal ve ultrasonografik muayenelerde ovaryumların küçük ve düz yapıda oldukları tespit edilir. Ayrıca ovaryumun üzerinde ovulatör büyüklüğe ulaşan foliküller ve KL'nin olmadığı gözlemlenmiştir (1). Bu nedenle tip I anöstrus görülen hayvanların ovaryumları inaktif ovaryum olarak adlandırılır (2). Tip-I anöstrusun patofizyolojisi çok iyi bilinmemekle birlikte başlıca nedenin beslenme yetersizliği olabileceği düşünülmektedir. Beslenme yetersizliği ve buna bağlı ortaya çıkan NED, foliküler büyümeyi ve dominant folikülün oluşmasını sağlayan LH'nin salınımını baskılayarak hayvanlarda tip-I anöstrus gözlenmesine neden olabilir (1).

2.2.3.2. Anovulatör Anöstrus Tip-II

Bu tip anöstrusta foliküller büyür, deviasyon noktasını geçmez ve dominant folikül haline gelir, fakat ovule olamadan regrese olurlar. Bu foliküllerin regresyonuyla beraber 2-3 gün içerisinde yeni bir foliküler dalga daha ortaya çıkar. Bu durum buzağılama sonrası ilk ovulasyondan önce birbirini izleyen, fakat ovulasyon ile sonuçlanmayan dalgaların oluşması şeklinde devam eder. Ovulasyonsuz foliküler dalganın sayısı dokuza kadar ulaşabilir ve bunun sonucunda postpartum anöstrus süresi uzayabilir (1). Foliküler dalganın ortaya çıkmasından sonra foliküllerin büyümesi ve gelişmesi için hipofizden yeterli miktarda LH salınımı gereklidir. Tip-II anöstrusta ise LH salınım sıklığı yetersiz olup, 3-4 saatte bir gerçekleşmektedir. Bu nedenle ovulasyon

gerçekleşmeden foliküller regrese olmaktadır (2). Bu tip anöstrus gösteren hayvanların tipik özelliği, ovaryumlarında ovulatör büyüklüğe ulaşan foliküller mevcutken, KL'nin bulunmamasıdır. Bu tip anöstrus, pre-pubertal düvelerde ve postpartum dönemdeki ve yetersiz beslenen ineklerde görülmektedir (24).

2.2.3.3. Anovulatör Anöstrus Tip-III

Bu tip anöstrusta folikül havuzundan çıkan foliküllerden birisi büyüyerek deviasyon noktasına ulaşır ve dominant folikül haline gelir, fakat ovule olamadan kalıcı hale geçer (2). Tip-III anöstrus görülen hayvanlarda 7 gün arayla yapılan ultrasonografik muayenede ovaryum üzerinde KL'nin bulunmadığı ve 8 mm'den büyük tek bir folikülün bulunduğu tespit edilmiştir (1). Kalıcı foliküller, luteal ya da foliküller kistler olarak gelişimlerine devam ederler. Bu tür kistlerin ortaya çıkmasındaki sebep; LH pikinin, folikülün ovule olma yeteneğinde olmadığı ya da folikülün üzerinde yeteri kadar LH reseptörünün gelişmediği zaman oluşmasıdır (2).

2.2.3.4. Anovulatör Anöstrus Tip-IV

Bu tip anöstruslarda foliküllerden birisi büyür, deviasyon noktasını geçip dominant folikül haline gelir. Gelişen dominant folikül LH salınımının etkisiyle ovule olur. Ovulasyon sonrası KL gelişir. Fakat normal bir şekilde östrus, ovulasyon ve KL gelişimine rağmen, luteal regresyonda aksama gerçekleşir. Bunun sonucunda KL kalıcı hale geçer ve luteal dönem uzar (1). Bu durum luteal dokunun varlığında şekillenen anovulasyon olarak da tanımlanabilir (30). Gebeliğin şekillenmediği sikluslarda dominant folikülden salgılanan östrojen, oksitosin reseptörlerini uyarır. Uyarılan oksitosin reseptörleri PGF2 α sentez mekanizmasını harekete geçirir ve endometriyumdan PGF2 α sentezlenir. Fakat luteal regresyon sırasında dominant folikülden, luteinizasyonu uyardırmaya yetecek kadar östrojen salgılanmadığı için PGF2 α 'nın sentezi uyarılamaz ve KL regrese olamaz. Tüm bu durumlar tip IV anöstrusa neden olur (30).

SONUÇ

Hayvancılık işletmelerinde hayvanların döl verimini optimum düzeyde tutmaya çalışmak öncelikli hedefdir. Anöstrus problemi, sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde bu hedefe ulaşılmasını zorlaştıran en önemli faktörlerden biridir. Anöstrus teşhisinin doğru bir şekilde ve erken yapılması oldukça önemlidir. Ülkemizde de sıklıkla karşımıza çıkan anöstrus sorununun temelinde bakım ve beslenme koşullarının yetersizliği yer almaktadır. Sonuç olarak; anöstrusun tedavisinden ziyade, bu probleme yol açan hazırlayıcı ve yapıcı etkenlere karşı önlem alınması daha etkin bir yol olarak kabul edilmektedir.

Çıkar çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Peter A., Vos P., Ambrose D., 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, 71, 1333-1342.
- Kumar PR., Singh SK., Kharche SD., Govindaraju CS., Behera BK., Shukla SN., Kumar H., Agarwal SK., 2014. Anestrus in cattle and buffalo: Indian perspective. *Adv Anim Vet Sci*, 2, 124-138.
- Madhuri G., Rajashri M., Kesharwani S., 2017. Post-partum anoestrus in dairy cows: A review. *Technology*, 6, 1447-1452.
- Pariza KF., Alam J., Islam MR., Hossain MM., Awal MA., 2013. Investigation of hematological and biochemical profiles of anoestrus zebu cows. *Bang J Vet Med*, 11, 57-60.
- Kumar J., Srivastava S., Kumar R., 2018. Studies on efficacy of janova, sepia and GnRH-PG-GnRH regimen on induction of cyclicity in postpartum anoestrus Cows. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 7, 22-28.
- Silva J., Figueiredo J., Van den Hurk R., 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71, 1193-1208.
- Roche JF., 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci*, 96, 282-296.
- Canadas ER., Gobikrushanth M., Fernandez P., Kenneally J., Lonergan P., Butler ST., 2019. Evaluation of alternative strategies to treat anoestrous dairy cows and implications for reproductive performance in pasture-based seasonal calving herds: a pilot study. *Theriogenology*, 127, 130-136.
- Hopper RM., 2014. Postpartum anestrus and its management in dairy cattle. In "Bovine Reproduction", Ed., M Richard, 1st ed., 456-464, Publisher Services, Pondicherry, India.
- Santos J., Rutigliano HM., Sa Filho M., 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 110, 207-221.
- Zhang J., Deng LX., Zhang HL., Hua GH., Han L., Zhu Y., Yang LG., 2010. Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 93, 1979-1986.
- Şenünver A., Nak Y., 2015. İnfertilite. In "Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji", Ed., A Semacan, M Kaymaz, M Fındık, A Şirvanlı, A Köker, 2th ed., 448-450 Medipres Matbaacılık, Malatya, Türkiye.
- Elmetwally MA., 2018. Uterine involution and ovarian activity in postpartum Holstein dairy cows. A review. *J Vet Health*, 1, 29-40.
- Buhecha KV., Dharmi AJ., Hadiya KK., Patel MD., Parmar SC., Killedar A., 2016. Influence of different estrus synchronization protocols on fertility and plasma progesterone in anoestrus crossbred cows. *Indian J Anim Sci*, 36, 1-5.
- Sakaguchi M., 2011. Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *J Reprod Dev*, 57, 17-33.
- Crowe M., 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 43, 20-28.
- Diskin MG., Mackey DR., Roche JF., Sreenan JM., 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle

- development in cattle. *Anim Reprod Sci*, 78, 345-370.
18. Hayırlı A., Çolak A., 2011. İneklerin kuru ve geçiş dönemlerinde sevk-idare ve besleme stratejileri: postpartum süreçte metabolik profil, sağlık durumu ve fertilitate etkisi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 2, 1-35.
 19. Dutta LJ., Nath KC., Deka BC., Bhuyan D., Borah P., Saikia GK., Bharali CAD., 2019. Therapeutic management of true anestrus crossbred cows through nutritional and hormonal intervention. *J Entomol Zool Stud*, 7, 9-12.
 20. Daşkın A., 2005. Sığırcılık işletmelerinde reproduksiyon yönetimi ve suni tohumlama. 1st ed., 157-158, Uğurer Tarım, Ankara.
 21. Yang MY., Fortune JE., 2015. Changes in the transcriptome of bovine ovarian cortex during follicle activation in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 47, 600-612.
 22. Lucy MC., 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 237-254.
 23. Walsh RB., Kelton DF., Duffield TF., Leslie KE, Walton JS., Le Blanc SJ., 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J Dairy Sci*, 90, 315-324.
 24. Fındık M., Ay SS., 2011. İneklerde ovaryumun işlevsel bozuklukları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 2, 66-73.
 25. Mwaanga E., Janowski T., 2000. Anoestrus in dairy cows: causes, prevalence and clinical forms. *Reprod Domest Anim*, 35, 193-200.
 26. Williams EJ., Sibley K., Miller AN., Lane EA., Fishwick J., Nash DM., Sheldon IM., 2008. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol*, 60, 462-473.
 27. Suchitra BR., Renukardhya GJ., Sahadev A., Shivaraju MV., 2016. CIDR and PGF_{2α} for induction of cyclicity in postpartum anestrus crossbred cows. *Intas Polivet*, 17, 49-52.
 28. Whitfield L., 2018. Ovarian ultrasound for fertility management in dairy cattle. *Livestock*, 23, 54-160.
 29. Mittal D., Garg UK., Jatav GP., Shukla S., Sharda R., 2010. Prevalence of different pathological affections of ovaries in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Malwa region of Madhya Pradesh. *Buffalo Bulletin*, 29, 39-42.
 30. Wiltbank M., Gümen A., Sartori R., 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57, 21-52.

YAZARLARA BİLGİ

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi "Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg." dir.
2. Bu dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış Temel Veteriner Bilimleri (Anatomi, Biyokimya, Fizyoloji, Histoloji, Mesleki Etik ve Deontoloji), Klinik Öncesi Veteriner Bilimleri (Farmakoloji ve Toksikoloji, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Patoloji, Viroloji), Klinik Veteriner Bilimleri (İç Hastalıkları, Cerrahi, Doğum ve Jinekoloji, Dölerme ve Suni Tohumlama), Zootekni ve Hayvan Besleme Bilimleri (Biyostatistik, Genetik, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Hayvancılık İşletme Ekonomisi, Zootekni), Hayvansal Orjinli Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Egzotik Hayvanlar Bilimi ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve davetli veya editörün onayı alınmış derlemeler yayımlanır.
3. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne yayımlanması amacıyla gönderilen makale ile ilgili olarak; yazarlar gerekli olan (klinik, deneysel çalışmalar vb.) etik kurulu onayı aldıkları kurum ve onay numarasını makalenin Materyal ve Metot kısmına yazmalıdırlar. Yayın kurulu eğer isterse etik kurul onay belgesini isteyebilir.
4. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)ına aittir.
5. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nca belirtilen "İhbarı Mecburi Hastalıklar" ile ilgili makalelerin değerlendirmeye alınabilmesi için T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan alınmış izin yazısının Dergi Editörlüğüne sunulması zorunludur.
6. Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makalenin yayına kabulü, hakemlerin ve dergi editörlüğünün kararına bağlıdır.
7. Sorumlu yazar Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisine yayımlanmak üzere göndereceği makale ile birlikte "**Makale Kontrol Formu**"nu da göndermek zorundadır.
8. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi' ne gönderilen makalelerde, makale değerlendirme süreci başladığı andan itibaren, makalede yazar ismi değişikliği ve isim sıralaması değişikliği yapılmaz.
9. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne ulaşan makale ve makale kontrol formu, dergi editörlüğünce ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

10. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nin etik politikası gereği intihale müsamaha gösterilmemektedir. Dergiye gelen tüm makaleler, intihal denetleyicisi yazılımı kullanılarak kontrol edilmektedir.

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. Makaleler, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, şekil, tablolar ve kaynaklarda dahil olmak üzere sayfa sayısı orijinal bilimsel araştırmalarda ve derlemelerde 16, olgu sunumu gibi kısa bilimsel çalışmalarda ise 5 sayfayı geçmemelidir.

2. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır.

3. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) ve sayfa numaraları (sayfa altında ve ortalı) eklenmelidir.

4. Makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje, vb.) makale başlığının sonuna üst simge olarak * işareti konulup makale başlığı altında italik yazıyla açıklanmalıdır.

5. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Orijinal Bilimsel Araştırma Makaleleri İçin:

Birinci Sayfa: makalenin birinci sayfası başlık, yazar isimleri ve adresleri, yazarların e-posta adresleri, sorumlu yazar iletişim bilgileri ve eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgidir oluşmalıdır.

Başlık: Türkçe ve İngilizce başlıklar sadece ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Makalenin dili Türkçe ise önce Türkçe sonra İngilizce başlık, makalenin dili İngilizce ise önce İngilizce sonra Türkçe başlık yazılmalıdır.

Yazar İsimleri ve Adresleri: Yazar(lar)'ın adı ve soyadının (akademik ünvanlı) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortalı gelecek şekilde yazılmalıdır. Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ üst köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve Ülke belirtilmelidir.

Yazarların e-posta Adresleri: makalede ismi bulunan tüm yazarların ismi ve e-posta adresleri yazılmalıdır.

Sorumlu Yazar İletişim Bilgileri: Makalenin sorumlu yazarına ait isim-soyisim, e-posta, adres, telefon, GSM ve fax numaralarını içeren bilgiler yazılmalıdır.

Makale ile İlgili Açıklayıcı Bilgi: Eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje vb.) birinci sayfanın sonunda italik yazıyla açıklanmalıdır.

İkinci Sayfa: Makalenin ikinci sayfası Türkçe özet ve anahtar kelimeler ile İngilizce özet ve anahtar kelimeleri içermelidir. Makale yazım dili Türkçe ise öncelikli olarak Türkçe özet ve anahtar kelimeler; eğer makale yazım dili İngilizce ise öncelikli olarak İngilizce özet ve anahtar kelimeler sunulmalıdır.

Özet: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Anahtar kelimeler “Türkiye Bilimleri Terimleri” nden seçilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com/tr-index.html>). En fazla 5 adet olmalıdır. Türkçe anahtar kelimeler Türkçe’ye göre, İngilizce anahtar kelimeler İngilizce’ye göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Her anahtar kelime arasına (,) işareti konulup, sonuncu anahtar kelimedenden sonra (.) işareti konulmalıdır.

Üçüncü Sayfa: Makale üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “MATERYAL ve METOT”, “BULGULAR”, “TARTIŞMA ve SONUÇ” ve “KAYNAKLAR” bölümleri halinde tamamlanmalıdır. Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, teşekkür de eklenebilir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır. Bölümlere ait alt başlıklar yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Tüm başlıklar koyu tonda ve 12 punto ile satırbaşı hizasında yazılmalıdır.

İstatistiksel Analiz bilgileri: makalenin MATERYAL ve METOT bölümünün sonunda “İstatistiksel Analiz” başlığı altında verilmelidir.

Birimler ve Kısaltmalar: Her bir kısaltmanın açılımı metinde ilk geçtiği yerde verilmelidir. Birimler ve ölçülerde Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri italik olarak yazılmalıdır. Makale içerisinde kullanılan rakamsal ve istatistiksel verilerde nokta kullanılmalıdır (örnek: 44.5; 0.82; % 97.7; $P < 0.01$ vb.).

Tablo ve Şekiller: Tablo ve Şekiller ana dökümandan ayrı olarak gönderilmelidir. Tablolar Dikey sayfa olanlar genişlik 7 cm’ye sığacak şekilde en fazla 35 satır, yatay sayfaya 15 cm’ye sığacak şekilde en fazla 25 satır olmalıdır. Şekiller bulanık olmayacak şekilde, jpeg, tiff, bmp veya gif formatında ve en az 150 dpi çözünürlükte hazırlanmalı, şekil üzerine yazılan yazılar ve işaretlemeler aynı şekilde resim işleme programlarında (Photoshop, paint vs.) “Calibri” fontu ile 12 puntoyu geçmemesi gerekmektedir. Grafikler resim formatında değil doc, docx, xls veyaxlsx formatında hazırlanmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde Şekil olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1). Tablo ve şekillerin başlık ve açıklamaları hem Türkçe hemde İngilizce olarak eklenmelidir. Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü kısaltma tablo ve şekil altında açıklanmalıdır.

Sonuç: Makaleye ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafı belirtmelidir.

Olgu Sunumları İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 120'den daha az olmamalı ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Üçüncü sayfadan itibaren "GİRİŞ", "OLGU SUNUMU" (olgu sunumu başlığı altında materyal, metot ve bulgulardan bahsedilmelidir) "TARTIŞMA ve SONUÇ" ve "KAYNAKLAR" şeklinde tamamlanmalıdır.

Olgu sunumu içerisinde eğer varsa İstatistiksel analiz bilgileri, birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Olgu sunumuna ait elde edilen/varılan sonuç, "TARTIŞMA ve SONUÇ" kısmının sonunda "sonuç olarak..." ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Derlemeler İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Derlemeler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Derleme üçüncü sayfadan itibaren GİRİŞ ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, SONUÇ ve KAYNAKLAR ile tamamlanmalıdır.

Derleme içerisinde eğer varsa birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Derlemeye ait sonuç, KAYNAKLAR bölümünden hemen önce SONUÇ başlığı altında belirtilmelidir.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne yayımlanmak üzere gönderilen derlemenin sorumlu yazarının derlemenin konusu ile ilgili en az 3 (üç) adet makalesinin olması gerekmektedir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır)

Kaynaklar

Kullanılan kaynak sayısı olgu sunumları için 10'dan az, araştırma makaleleri için 20'den az ve tüm makale türleri için 45'den fazla olmamalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kullanılan kaynakların (makalenin gönderildiği yıl baz alınarak) en az üçte birlik kısmı son 3 yıla ait olmalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kaynaklar aşağıda belirtildiği şekilde sunulmalıdır:

Metin içerisinde:

Metin içerisinde kaynaklara 1'den başlamak üzere numara verilmelidir ve bu numaralar (1), (1,2), (1,4-7,13) şeklinde parantez içerisinde belirtilmelidir. Yazar isminin kullanılacağı yerlerde ise yazarın soyadı ve parantez içerisinde kaynağın numarası Aktaş (22), Aktaş ve ark. (13) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

Kaynaklar Bölümünde:

Metin içerisinde numaralandırılan kaynaklar, makalenin kaynaklar bölümünde numaralarına göre sıralandırılmalıdır.

Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin isminin kısaltması kullanılmalıdır.

Kaynak makale ise; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun*, 69, 4657-4660.

Kaynak kitap ise; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

Kaynak kitapta bir bölüm ise; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, 6th ed., 230-250, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kaynak bir tez ise; Aktaş MS., 2005. Köpeklerde antibiyotiklerin neden olduğu ishallerde probiyotiklerden *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Kaynak bir kuruluşün yayını ise; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

Kaynak bir yazılım ise; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.

Web tabanlı kaynaklar kullanılmamalıdır.

MAKALENİN GÖNDERİLMESİ

Makale online sistem (<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>) aracılığıyla dergi editörlüğüne gönderilmelidir.

DERGİ BASKISI

Kabul edilen çalışmalar **ücretsiz** basılacaktır.

Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

Sorumlu yazara makalenin basıldığı sayıdan bir örnek ücretsiz olarak gönderilir.

2018 yılından itibaren, derginin baskısı siyah-beyaz olarak yapılacaktır. Makalelerinde renkli resim/figür/şekil bulunan yazarlar, renkli baskı istemeleri halinde, gerekli ücreti ödemeleri halinde bu istekleri yerine getirilecektir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- 1.** Atatürk University Journal of Veterinary Sciences is a refereed scientific publication organ of Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences and is published tri-annually in April, October and December. The abbreviation of the journal's title is "Atatürk University J. Vet. Sci."
- 2.** Original research papers, case reports and invited or Editor-approved reviews to be submitted should be prepared either in Turkish or in English, must not be published elsewhere or submitted concomitantly to any other journal, within the scope of Veterinary Medicine and relevant Departments, i.e. Basic Veterinary Sciences (Anatomy, Biochemistry, Physiology, Histology, Occupational/Professional Ethics and Deontology), Preclinical Veterinary Sciences (Pharmacology and Toxicology, Microbiology, Parasitology, Pathology, Virology), Clinical Veterinary Sciences (Surgery, Internal Medicine, Obstetrics and Gynecology, Reproduction and Artificial Insemination), Animal Science and Nutritional Sciences (Biostatistics, Genetics, Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Animal Enterprises Economy, Animal Science), Animal-Originated Food Hygiene and Technology, with, exotic animal science and laboratory animals, are published in this journal.
- 3.** Ethics committee approval (clinical, experimental, etc.), institution, and approval number are required for the article sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must be specified in the Material and Method section of the article. The editorial board may also request an ethics committee approval document when deemed necessary.
- 4.** Authors are responsible for complying with the copyright conditions related with the material cited (taken) from other resources or used and signing the agreement contract declaring transfer of the copyright to the journal. The full responsibility of the texts to be appeared within the journal belongs to the author(s).
- 5.** Manuscripts to be considered are sent to the two referees at least. Acceptance of the manuscripts depends on both suggestion of the referees and final decision of the Editorial Board.
- 6.** The responsible author has to send the "Article Check List" along with the article to be sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication.
- 7.** We will not be able to make any changes to the author names (adding/removing authors, change of order of authors) at the article send to Atatürk University Journal of Veterinary Science from the moment the paper evaluated process begins
- 8.** Article and article check list reaching Atatürk University Journal of Veterinary Sciences Editor is subject to preliminary evaluation by a journal editor. The editorial has the right to refuse the article according to the preliminary evaluation result or to request a correction before subjecting it to the referee evaluation.

9. According to the ethics policy of Atatürk University Journal of Veterinary Sciences, plagiarism is not tolerated. All manuscripts received are checking using plagiarism checker software.

MANUSCRIPT PREPARATION

1. Manuscripts should be written in A4-sized paper (one-sided), double-spaced, with 3 cm space from the margins of the paper and should not exceed 16 pages for original scientific researches and reviews or 5 pages for short scientific studies such as case reports.

2. Manuscript should be prepared using Microsoft Word 6.0 or upper versions, in Calibri characters with 12 point typing size.

3. Line numbers (be started from the 2nd page onwards) and page numbers (at the middle of the bottom of the page) should be given in the manuscript.

4. Details (thesis, project, etc.) related with the manuscripts should be given at the end of the title of the manuscript with the sign of superscript (*) with further explanation below the title in italic format.

5. Trademarks of substances (materials) and products of the subject of the study should not be used.

For Research Articles:

First page: The first page of the manuscript should contain title, authors' name-surname and addresses, e-mail addresses of the authors, corresponding authors' explanatory details related with the manuscripts, if any.

Title: Titles in Turkish and English should be written in small letters with only the first letter to be in capital. In case of the Turkish language of the main text, firstly titles in Turkish then in English should be given, while the opposite should be given for manuscripts written in English.

Names of authors and addresses: The first letters of name and surnames (without academic titles) of author(s) should be written in capital and aligned at the middle below the title. Corresponding author (*) should be pointed, a value should be added as a superscript at the right and these values should be used in the section of addresses. In that section, the body/authority, unit/department, city and country of the authors should be described.

E-mail addresses of the authors: All the names and e-mail addresses of authors mentioned within the manuscript should be written.

Contact details of the corresponding author: The name-surname, e-mail, address, phone, mobile and fax numbers of the corresponding author should be written.

Explanatory details of the manuscripts: If any, the explanatory details (thesis, project, etc.) should be written in *italic* letters at the end of the first page.

Second page: The second page of the manuscript should contain summary in Turkish and English with key words each. If the language of the main text is in Turkish, the summary and the key words should first be in Turkish while the opposite should be given for those manuscripts written in English.

Summary: Briefly, it should contain the aim, material, method, results and conclusions. The number of word to be used should be between 170-200 words and be written in single-space.

Key words: The number should be 5 at maximum in the alphabetic order of the language used either in Turkish or in English. Between each of the words, a comma (,) sign should be put while a full stop (.) sign should be put at the end of the last one.

Third page: From this page onwards, the manuscript should continue with the sections of INTRODUCTION, MATERIALS and METHODS, RESULTS, DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES in the following order. The sections of results and discussion may be given together. A section of acknowledgement may also be added, if needed. Section titles should be written in capital letters. Sub-headings of the sections should be written with the first letters in capital only and aligned with the beginning of paragraph. All the headings should be written in black 12-point typing-size and aligned with the beginning of paragraph.

Data from Statistical analyses: This section should be given at the end of MATERIALS and METHODS section and under the title of “Statistical Analysis”.

Units and Abbreviations: The meaning of each abbreviation should be given where it appears first. For units and measurements, International Standard units (SI-system) should be used. The names of genus (breeds) and species should be written in italic style. For numerical and statistical values, full stop (.) sign should be used (e.g. 44.5; 0.82; 97.7 %; P<0.01, etc.).

Tables and Figures: Figures, graphics, photos and pictures/plates within the headings and text should all be given as Figure. Figures and tables should be numbered according to their orders within the text and written without any abbreviation within the paragraph (e.g. Figure 1, Table 1). Tables and figures should be placed into the sections appropriately, and their headings and explanations should also be included in Turkish and English. All types of abbreviations used within tables and figures should be explained below them.

Conclusion: The ultimate result obtained should be described as “In conclusion,…” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Case Reports:

The first and second pages should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The number of words to be used in summary should not be less than 120 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, INTRODUCTION, CASE REPORT (materials, methods and results should be mentioned under the title of case report) should be followed by DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES.

If any, data from the statistical analysis, units and abbreviations, tables and figures should be presented as given for scientific research manuscripts.

For case report, the ultimate result obtained should be described as “In conclusion,...” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Reviews:

The first and second pages of reviews should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The summary should involve data on the subject and aim of the review. The number of words used in summary should be between 170-200 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, reviews should start with introduction, continue with subheadings to be determined by the author(s) and be completed with CONCLUSION and REFERENCES.

If any, the units and abbreviations, tables and figures within the review should be presented as given for scientific research manuscripts.

For reviews, the ultimate result should be described as CONCLUSION section in a single paragraph just before the section for REFERENCES.

The corresponding author of the compilation sent to the Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must have at least 3 articles on the subject of the compilation. The corresponding author must send the citation information of relevant articles related to the subject along with his/ her article (relevant article citations must be presented on the last page of the article)

References

The number of resources used must not be less than 10 for case reports, less than 20 for research articles, and more than 45 for all article types.

Regardless of the type of article (original research article, case report, compilation), at least one-third of the resources used (based on the year the article was submitted) must belong to the last three years.

Regardless of the type of manuscript (original research paper, case report, review), references should be given, as follows:

For Text section:

Within the text, reference numbers should be given as numbers starting from 1, and these numbers should be indicated within the brackets as (1), (1,2), and/or (1,4-7,13). Where the name of the author is to be given, the surname of the author and reference number should be written as Aktas (22), and/or Aktas et al. (13).

For References section:

The references given within the text should be given as numbers in numerical order within the reference section.

For writing the scientific journals, its international title recommended by the journal should be used. The journal title abbreviation must not be used.

For manuscripts; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity*, 69, 4657-4660.

For books; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th edn., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

For chapters of a book; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In “Textbook of Veterinary Internal Medicine”, Ed., SJ Ettinger, 6th edn., 230-250, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

For theses; Aktas MS., 2005. Efficacy of *Saccharomyces Boulardii* as a probiotic in Dogs with lincomycin induced diarrhoea. Ankara University, Graduate School Health Science, Turkey.

For publications of a Foundation; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

For softwares; SAS, 1990. SAS user’s guide: Statistics, 4th edn., SAS Institute, Cary.

Web-based references should not be used.

MANUSCRIPT SUBMISSION

The article must be sent to the journal editor through online system (<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/ataunivbd/>).The file names of original manuscripts and tables should involve a “.doc” extension.

Figures (graphs, photos, figures and pictures/plates) should be submitted, as a separate file, in JPEG format with 300 DPI resolutions.

JOURNAL'S PRESS

Articles accepted for publication will be published free of charge.

No offprints will be sent to the authors.

A copy of the issue of the journal with the article is sent for free to the corresponding author of the article.

From 2018 on, the print of the journal will be done in black and white. Authors who have colored pictures / figures / figures in their articles, in the case of color printing requests, this demand will be fulfilled in case of payment of the necessary fee.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

YAYIN HAKLARI DEVRİ SÖZLEŞMESİ

Makale Türü: () Araştırma () Derleme () Olgu Sunumu () Diğer

Makale Başlığı:.....

.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Yazarın Adı ve Soyadı
(Makaledeki İsim Sırasına Göre)

İmza

Tarih

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Telefon/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra e-posta adreslerimizden herhangi birine gönderiniz.

DERGİ ADRESİ

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü, 25240 Kampüs/ERZURUM-TÜRKİYE

Tel: +90 442 2360880, Fax: +90 0442 2360881, E-posta: veterdergisi@atauni.edu.tr/ atavetderg@hotmail.com

ATATÜRK UNIVERSITY JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT DECLARATION FORM

Type of Manuscript: () Research () Review () Case Report () Other
Title of Manuscript:.....
.....

We, as the authors of manuscript having type and title aforegiven, declare that; i) this manuscript submitted to The Editor of Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication, as prepared in complying with the instructions for authors, is original, ii), it has not been published partially or totally or submitted synchronously to other publishing body, iii) all the possible scientific and ethical responsibilities, without any further responsibility of The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences at all, following the publication of manuscript are belong to us, iv) we transfer all the copyrights along with the corrections recommended by the advisor and Editor to The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences following the date of publication of the manuscript.

However, other than the copyright conditions described; i) the authenticated rights (such as patent), ii) the right of use of the manuscript, totally or partially, for scientific activities such as books and lectures, with no charge and iii) dissemination of the manuscript by the authors without commercial purposes are all reserved.

	Name and Surname of the author (in the manuscript's order)	Signature	Date
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:.....Signature:.....

Note: Please send the form to either of our e-mail addresses after filling in the blanks.

JOURNAL'S ADDRESS

Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences, The Editor of Atatürk University J. Vet. Sci., 25240-Campus/Erzurum-TURKEY

Phone: +90 442 2360880, Fax: +90 0442 2360881, E-mail: vetdergisi@atauni.edu.tr or atavetderg@hotmail.com

Araştırma Makaleleri / Research Articles

▶ Artina PRASTIWI, Zafer OKUMUŞ, Armağan HAYIRLI, Demet ÇELEBİ, Latif Emrah YANMAZ, Elif DOĞAN, Mümin Gökhan ŞENOCAK, Uğur ERSOZ. Effectiveness of Copper Sulfate Solutions in Footbaths in Dairy Cattle (<i>Süt Sığırları Ayak Banyolarında Bakır Sülfat Solüsyonlarının Etkinliği</i>).	238-245
▶ Saadet BELHAN, Gökhan OTO, Okan ARIHAN, Volkan KOŞAL. Changes in Sperm Parameters Following Administration of Theophylline, a Competitive Antagonist of Adenosine in Rats Exposed to Bleomycin, a Chemotherapeutic Agent (<i>Bir Kemoterapotik Ajan Olan Bleomisine Maruz Kalan Ratlarda Adenozinin Kompetitif Antagonisti Olan Teofilinin Uygulanması Sonrasında Sperm Parametrelerindeki Değişimler</i>).	246-251
▶ Mohammad ALHILAL, Suzan ALHILAL, Thana ALBAZ. The Effects of Borage Oil on Hyperlipidemic Diet-induced Liver Damage in Male Golden Syrian Hamsters (<i>Altın Suriye Hamsterlarında Hiperlipidemik Diyet ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Hodan Yağının Etkileri</i>).	252-262
▶ Mian Nazir SHAH, Aamir IQBAL, Muhammad RIAZ, Samiullah KHAN, Muhammad Tahir KHAN, Abdur Rahman SIAL, Ismail BAYRAM. Effect of Graded Supplementation Levels of Golden Chain Tree (<i>Cassia Fistula L.</i>) Leaves on Feed Intake, Nutrients Digestibility and Plasma Lipids Profile in Growing Rabbits (<i>Büyüme Dönemindeki Tavşan Rasyonlarına Farklı Oranlarda Altın Zincir Ağacı (Cassia Fistula L.) Yaprakları İlavesinin Yem Tüketimi, Besin Maddesi Sindirilebilirliği ve Plazma Lipit Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması</i>).	263-272
▶ Lotfi MOUSSOUNI, Omar BESSEBOUA, Abdelhanine AYAD. Anthelmintic Activity of Aqueous and Ethanol Extracts of <i>Urtica dioica L.</i> and <i>Myrtus communis L.</i> Leaves on Bovine Digestive Strongyles: In-Vitro Study (<i>Urtica dioica L. ve Myrtus communis L. Yapraklarının Sulu ve Etanolik Ekstraktlarının Sığır Sindirim Strongilozu Üzerine Antelmintik Aktivitesi: İn-vitro Çalışma</i>).	273-283
▶ Caner BAYRAM, Derviş ÖZDEMİR. Karataavukta (<i>Turdus merula</i>) Neurocranium'un Makro-Anatomik Olarak İncelenmesi (<i>Macro-Anatomical Examination of the Neurocranium in The Blackbird (Turdus merula)</i>).	284-289
▶ Nuket KAMIŞ, Funda KARABAĞ ÇOBAN. Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması (<i>D Investigation of Caffeic Acid Phenethyl Ester Effect on Inflammation and Oxidative Stress in Paracetamol Induced Hepatotoxicity</i>).	290-298
▶ Deniz YENİ, Fatih AVDATEK, Mustafa GÜNDOĞAN. Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi (<i>The Effect of Different Concentrations of Bovine Serum Albumin on Sperm Quality and DNA Damage in Short Term Stored Ram Semen</i>).	299-306
▶ Yasemin KAPLAN, Nihat ÖZYURLU, Mehmet KÖSE, Mehmet Osman ATLI, İbrahim KÜÇÜKASLAN, Mesut KIRBAŞ. Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profiline Belirlenmesi (<i>Detection of Plasma Profile of Pregnancy Associated Glycoproteins During Early Pregnancy in Pregnant Konya Merino Sheep</i>).	307-314
▶ Şaziye Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ, Büşra DUMLU, Royale AHMADOVA. Katıfaz Fermentasyonu ile Arpanın Besin Değerinin İyileştirilmesi (<i>Improving the Nutritional Value of Barley by Solid State Fermentation</i>).	315-323
▶ Murat Alper ÜRE, Fatih BÜYÜK. Kars Yöresinde Kazlarda <i>Salmonella</i> Enteritidis Antikorlarının ELISA ile Araştırılması (<i>Investigation of Salmonella Enteritidis Antibodies in Geese in Kars Province by ELISA</i>).	324-329

Olgu Sunumu/Case Report

▶ Aynur DEMİR, Gülşen Sevim KARAGÖZOĞLU, Burcu Ezgi EREGAR. Anterior Uveitis and Aqueous Lipidose Associated with Hyperlipidemia in Two Cats (<i>İki Kedide Hiperlipidemi ile İlişkili Anterior Üveit ve Aköz Lipidozis</i>).	330-334
--	---------

Derlemeler / Reviews

▶ Alisa SMAJOVIĆ, Muhamed KATICA, Davorka ZAVRŠNIK, Elma VELJOVIĆ, Kenan ČAKLOVICA. Application of Xanten and Its Derivatives in Human and Veterinary Medicine (<i>Xanten ve Türevlerinin İnsan ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı</i>).	335-342
▶ Süleyman KOZAT. Yenidoğan Buzağılarda Kolostrum Yönetiminin Önemi (<i>The Importance of Colostrum Management in Newborn Calves</i>).	343-353
▶ Damla Tuğçe OKUR, Bülent POLAT. İneklerde Anöstrus: Nedenleri ve Sınıflandırılması (<i>Anoestrus in Cows: Causes and Classification</i>).	354-361