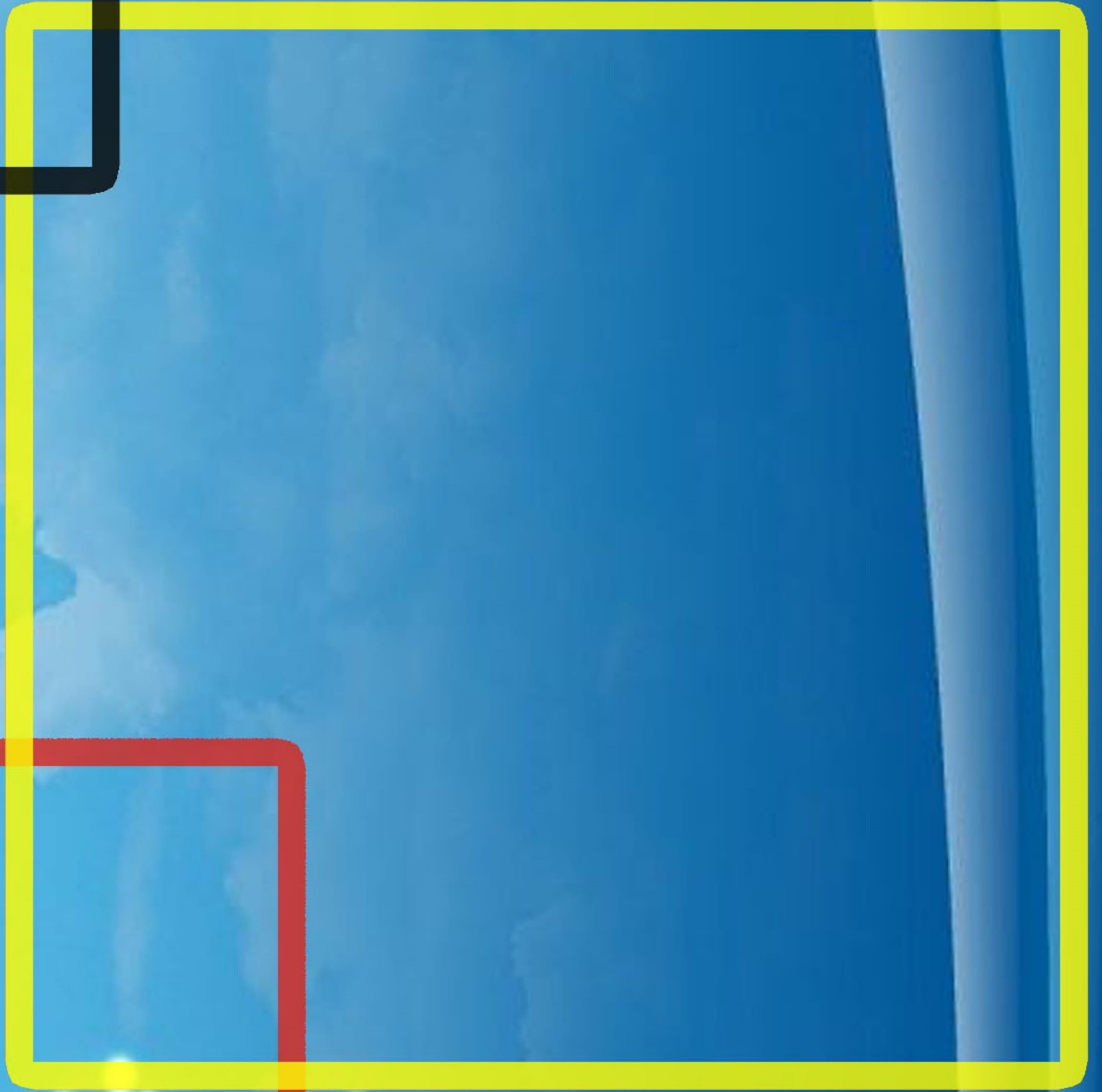




VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2020 / Volume: 31 / Issue: 1

ISSN : 2149-3359
e-ISSN : 2149-8644





March - 2020



VAN VETERINARY JOURNAL

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

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT

Van YYU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu

Kampus / Van - Turkey

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

e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors (Editorial Board)

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)

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

Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)

Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Section Editor)

Prof. Dr. Ozgur ISLEYICI (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Leyla MIS (Section and Technical Editor)

Assoc. Prof. Dr. Bekir OGUZ (Section and Electronic Journal Editor)

Assoc. Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)

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

Publication Board

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

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

Prof. Dr. Abeer F. El Nahas (Alexandria, EGYPT)

Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)

Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)

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

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

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

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

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

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

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

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

Prof. Dr. Logman ASLAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

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

Prof. Dr. Oguz SARIMEHMETOGLU (Univ. of Ankara)

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

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

Prof. Dr. Ufuk Tansel SIRELI (Univ. of Ankara)

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

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

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

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

Assoc. Prof. Dr. Cristian Magdas (Cluj-Napoca, ROMANIA)

Assoc. Prof. Dr. Cumali OZKAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Feraye Esen GURSEL (Univ. of Istanbul-Cerrahpasa)

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

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

Assist. Prof. Dr. Ali Rıza BABA OGLU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

Dr. Omar ATROOZ (Mutah, JORDAN)

Scientific Board of This Issue

Assist. Prof. Dr. Omer AKGUL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

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

Prof. Dr. Gursoy AKSOY (Univ. of Hatay Mustafa Kemal)

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

Assoc. Prof. Dr. Ozgur CELEBI (Univ. of Kafkas)

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

Assist. Prof. Dr. Ismail DEMIRCI OGLU (Univ. of Harran)

Assist. Prof. Dr. Metin ERTAS (Univ. of Hakkari)

Prof. Dr. Timur GULHAN (Univ. of Ondokuz Mayıs)

Prof. Dr. Murat KABAK (Univ. of Ondokuz Mayıs)

Prof. Dr. Huseyin KARADAG (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Res. Assist. Dr. Emre KAYA (Univ. of Firat)

Prof. Dr. Ozgur KAYNAR (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Huseyin NURSOY (Univ. of Bingol)

Assist. Prof. Dr. Ugur OZDEK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Cumali OZKAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Serkan YILDIRIM (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Nazmi YUKSEK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ibrahim YORUK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

This journal is published three times a year

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

| Year | Volume | Issue |
|------|--------|-------|
| 2020 | 31 | 1 |

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, ROOT INDEXING, J-Gate, COSMOS IF, TUBITAK-ULAKBIM, DRJI, ResearchBib, Turkiye Atif Dizini and Google Scholar

VAN VETERİNARY JOURNAL

ISSN: 2149-3359 / E-ISSN: 2149-8644

March 2020

CONTENTS

Page

Original Articles

- **Aydogdu M, Karsli MA.** The Effects of Live Yeast Culture Use in Suckling Simmental Calves on Performance and Health (Canlı Maya Kültürü Kullanmanın Süt Emen Simental Buzağlarda Performans ve Sağlık Üzerine Etkileri) **1-6**
- **Ilgun R, Ozudogru Z.** Macroanatomical and Morphometric Investigation of Mandibula in Aksaray Malaklı Dogs (Aksaray Malaklı Köpeklerinde Mandibula'nın Makro-Anatomik ve Morfometrik Olarak İncelenmesi) **7-11**
- **Avsever ML.** First Isolation of *Salmonella enterica* Serotype Newport (Sn) From Land Turtles (Testudo Graeca Ibera) Cultured in Turkey (Türkiye'de Kültüre Edilen Kara Kaplumbağalarından (*Testudo Graeca Ibera*) İlk *Salmonella enterica* Serotype Newport (Sn) İzolasyonu) **12-14**
- **Abdullah KM, Basbugan Y.** The Effect of Used Immunostimulating Drugs with FMD Vaccine on Immunoglobulins in Sheep (Koyunlarda Şap Aşısı ile Birlikte Kullanılan İmmunstimulan İlaçların İmmunglobulinler Üzerine Etkisi) **15-21**
- **Ozdek U, Seckin H, Cibuk S.** Investigation of Antimicrobial Effects of *Amygdalus Trichamygdalus* (Sweet Almond) and *Amygdalus nana L.* (Bitter Almond) Plants (*Amygdalus Trichamygdalus* (Tatlı Badem) ve *Amygdalus nana L.* (Acı Badem) Bitkilerinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması) **22-26**
- **Kaya E, Yılmaz S, Ceribasi AO, Telo S.** Investigation of the Protective and / or Therapeutic Effects of Lycopene on Diethylnitrosamine-Induced Chronic Hepatotoxicity Using Biochemical, Molecular and Histopathological Data (Biyokimyasal, Moleküler ve Histopatolojik Veriler Kullanarak Likopenin Dietilnitrozamine Bağlı Kronik Hepatotoksisite Üzerine Koruyucu ve / veya Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması) **27-33**
- **Yılmaz O, Soyguder Z, Yavuz A.** Three-Dimensional Investigation by Computed Tomography of the Clavicle and Scapula in Van Cats (Van Kedilerinde Clavicula ve Scapula'nın Bilgisayarlı Tomografi Görüntülerinin Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi) **34-41**
- **Yasar S, Sogutlu I.** Investigation of Acidity, Diastase Number, HMF, Insoluble Dry Matter and Ash Percentage Values of Some Honey Samples Produced in Bingöl and Districts (Bingöl ve İlçelerinde Üretilen Bazı Bal Örneklerinin Asitlik, Diyastaz Sayısı, HMF, Suda Çözülmeyen Kuru Madde ve Kül Yüzdesi Değerlerinin Araştırılması) **42-45**
- **Balkan BM, Kismali G, Cengiz S, Sel T.** The Effect of Hormonal Treatment on Cell Viability in F98 Cell Line (Hormon Uygulamalarının F98 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi) **46-49**

Review

- **Biberoglu O.** The Determination of *Listeria monocytogenes* in Foods with Optical Biosensors (Gıdalardan *Listeria monocytogenes*'in Optik Biyosensörlerle Belirlenmesi) **50-55**

Case Report

- **Atasever A, Ekebas G.** Spontaneous Tuberculosis Cases In Two Pigeon Flocks (İki Güvercin Sürüsünde Spontanöz Tüberküloz Vakaları) **56-59**

This journal is published three times a year. All articles in this journal are available free of charge from <http://dergipark.gov.tr/vanvetj>

Year: 2020 / Volume: 31 / Issue: 1

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, ROOT INDEXING, J-Gate, COSMOS IF, TUBITAK-ULAKBIM, DRJI, ResearchBib, Türkiye Atif Dizini and Google Scholar



The Effects of Live Yeast Culture Use in Suckling Simmental Calves on Performance and Health

Mustafa AYDOĞDU^{1*} M. Akif KARSLI²

¹ Çorum Food, Agriculture and Livestock Provincial Directorate, Çorum, Turkey

² Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, Kirikkale, Turkey

Received: 12.02.2019

Accepted: 04.12.2019

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of live yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on calf live weight gain, daily live weight gain, feed intake, feed efficiency and health. Three groups were created by using calf fed starter diet without live yeast culture (Control group=C), with 5 gr/calf/day live yeast culture (Low dose live yeast culture =LDLYC) or 10 gr/calf/day live yeast culture (High dose live yeast culture =HDLYC). Blood samples were withdrawn from each calves at the end of experiment. Average birth weights of calves were 41.58, 42.42, 41.17 kg whereas average weaning live weights were 81.50, 84.58, and 85.58 kg for C, LDLYC and HDLYC, respectively. Daily live weight gains and total amount of weight gained during experiment were 0.67, 0.70, and 0.74 kg/d; and 39.92, 42.17, 44.42 kg for C, LDLYC and HDLYC, respectively. Mean daily feed intakes were 282.26, 300.65, and 254.01 gr/d for C, LDLYC and HDLYC, respectively. Mean feed efficiency values were 418.89, 419.44, and 342.93 gr feed/kg daily weight gain for C, LDLYC and HDLYC, respectively. Percentage of calves that had diarrhea during experiment was 83.33, 66.67 and 33.33 % for C, LDLYC and HDLYC, respectively. While the percentages of lymphocyte (P=0.06) linearly decreased the percentage of neutrophil (P=0.05) linearly increased with increasing levels of live yeast culture. In conclusion, it was thought that even though it was not statistically significant, addition of live yeast culture improved live weight gain, feed efficiency, and calf health and may have positive effect on immunity.

Keywords: Live Yeast Culture, Suckling Calf, Live Weight Gain, Feed Efficiency

öz

Canlı Maya Kültürü Kullanmanın Süt Emen Simental Buzağlarda Performans ve Sağlık Üzerine Etkileri

Bu çalışmada canlı maya kültürünün buzağların canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi, yemden yararlanma ve sağlığı üzerine etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Katkısız ticari buzağı başlangıç yemi (K=Kontrol), ticari buzağı başlangıç yemine ile 5 gr/buzağı/gün (DCMK=Düşük Canlı Maya Kültürü) ve 10 gr/buzağı/gün (YCMK=Yüksek Canlı Maya Kültürü) canlı maya kültürü tüketen buzağı gruplarından oluşan 3 grup oluşturulmuştur. Çalışmanın sonunda bütün buzağlardan kan alınmıştır. Doğum ağırlıkları K, DCMK, YCMK sırasıyla; 41.58, 42.42, 41.17 kg, süttten kesme ağırlıkları ise aynı sırayla 81.50, 84.58, 85.58 kg olarak ölçülmüştür. Canlı ağırlık artışları değerlendirildiğinde DCMK, YCMK ve K için; 0.70, 0.74 ve 0.67 kg/gün, toplam canlı ağırlık artışı ise aynı sırayla 42.17, YCMK 44.42 ve kg 39.92 kg olarak belirlenmiştir. Deneme süresince DCMK 18039.17 gr, YCMK 15240.83 gr ve K 16935.83 gr yem tüketmişlerdir. Ortalama günlük tüketimleri ise DCMK 300.65 gr/gün, YCMK 254.01 gr/gün ve kg 282.26 gr/gün olarak hesaplanmıştır. Yemden yararlanma değerleri ise DCMK 419.44 gr yem/kg ağırlık artışı, YCMK 342.93 gr yem/kg canlı ağırlık artışı ve K 418.89 gr yem/kg ağırlık artışı olarak hesaplanmıştır. Deneme süreci boyunca buzağlarda isal görülme oranı DCMK de %66.67, YCMK de %33.33 ve K da ise %83.3 olarak tespit edilmiştir. Kan hücrelerinden lenfosit oranı katılan katti oranına paralel olarak azalırken nötrofil oranının (P=0.05) ise lineer olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, süt buzağılarına verilen mayanın istatistiksel olarak olmasa da canlı ağırlık artışı, yemden yararlanmayı, buzağı sağlığını iyileştirdiği ve immum sistem üzerine de olumlu etkisi olabileceği kanaati oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: Canlı Maya Kültürü, Süt Buzağısı, Canlı Ağırlık Artışı, Yemden Yararlanma

GİRİŞ

Sürülerdeki temel ve en önemli sınırlandırıcı etken doğum sonrası buzağı mortaliteleridir. Dünya çapında, neonatal buzağı mortalite oranları %8.7'den %67'ye kadar değişkenlik gösterir. İlk aylarda görülen neonatal buzağı mortalitesi, toplam mortalite oranlarının %84'ünü oluşturur ve özellikle buzağuların yaşamının üçüncü haftalarında görülme oranı yüksektir. Bazı araştırmacılara göre; buzağularda ve manda yavrularında görülen mortalite oranları %29.1 ile %39.8 arası değişir. Ayrıca, erken dönemdeki buzağı mortalitelerinin ortalama %25'i, düşük verimli hayvanlardan olduğundan, bu sırada kontrol amacıyla çeşitli uygulamalar yapılsa da, sürü sağlığında yapılması gereken prosedürler daha zordur (Anonim 2016).

Buzağı ölümleri gelişmiş ülkelerde %2-3 civarında iken maalesef bu oran ülkemizde %15 civarındadır. Yeni doğan buzağı ishalleri bütün dünyada yaygın olarak gözlemlenir, süt hayvancılığı ve besicilik yapılan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Mortalite oranı gelişmiş Avrupa ülkelerinde %10-15 arasında değişmekle birlikte, işletmeden işletmeye farklı oranlarda ortaya çıkarak, %50'ye varan daha şiddetli kayıplar söz konusu olabileceği gibi, kayıp oranı % 1-2 olan işletmelerde bulunabilir. Hastalığın problem olduğu çiftliklerde buzağuların %100'ü hastalığa yakalanabilir. İsale bağlı buzağı kayıplarının ülkemizde içinde ciddi sorun olduğu bilinmektedir (Şahal ve ark. 2017).

Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiklerin, hayvansal ürünlerde kalıntı bıraktığı ve bu hayvansal ürünleri tüketen insanlarda bazı alerjik reaksiyonlara yol açtığı ve sonuçta insanlarda hastalık yapan bazı bakterilerin tedavide kullanılan antibiyotiklere direnç kazanmalarına yol açtığı yolundaki bazı bulgular; antibiyotiklere olan güvenin zayıflamasına yol açmıştır. Bununla beraber, sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalarla beraber bazı faydalı mikroorganizmaların da ölümüne neden olduğu bildirilmektedir. Tüketicilerin artan bilinç ve baskıları sonucu, antibiyotiklerin verim artırıcı olarak kullanılmasının insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileriyle ilgili bazı bulguların ardından ilk kez 1986 yılında İsveç'te büyüme faktörü amaçlı kullanımı yasaklanmış, daha sonra 01 Haziran 1999 yılında Avrupa Birliği'nde belirtilen amaçla kullanımlarına sınırlama getirilmiştir. Ülkemizde ise bu karar Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nca alınmış ve 30 Eylül 1999'da antibiyotiklerin hayvan yemlerinde verim artırıcı olarak kullanılması yasaklanmıştır (Saygıcı ve Günel 200; Öztürk ve Yıldırım 2004).

Antibiyotiklerle ilgili bu yasal gelişmeler, oluşan boşluğun doldurulması için probiyotik, prebiyotik ve bitki ekstraktları gibi alternatif yem katkı maddelerini gündeme getirmiştir. Probiyotiker, mide-bağırsak flora ve faunasını düzenlemek, patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemek ve yemden yararlanmayı artırmak gibi amaçlarla yeme toz, granül, sıvı süspansiyon, kapsül ve pelet formlarında karıştırılan ya da içme suyuna verilen canlı bakteri veya maya kültürleri içeren biyolojik ürünlerdir.

Bu çalışmamızda süt emme dönemindeki buzağularda bir probiyotik olan canlı maya kültürü kullanımının buzağuların canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi, yemden yararlanma ve sağlığı üzerine etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Çorum Merkez Ova Karapınar Köyünde bir Simental Irkı Damızlık Süt Sığırı işletmesinde yeni doğan buzağulardan doğum sırası ve cinsiyete göre seçilen 3 farklı grupta toplam 18 adet buzağınını; Canlı *Saccharomyces cerevisiae* kültürü içeren Vimasacc® isimi ticari maya'nın buzağularda canlı ağırlık artışı, yem tüketimi, yemden yararlanma ve sağlığı üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Hayvanlar doğumlarından itibaren doğum sırası ve cinsiyetine göre düşük doz canlı maya kültürü (DDG), yüksek doz canlı maya kültürü (YDG) ve kontrol grubu (KG) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Her bir gruba 3 dişi ve 3 erkek olmak üzere toplam 6 şar buzağı seçilmiştir. Kontrol grubu dahil denemeye alınan buzağı sayısı 18 baştır. Her bir buzağının doğumu takip eden ilk 2 saat içerisinde tartımı yapılarak doğum ağırlığı kaydedilip bireysel buzağı kulübelere alınmıştır. Kulübelere alınırken Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının plastik tanımlama küpesi ile küpelenerek numaraları kaydedilmiştir.

İlk üç gün kolostrum verildikten sonra 4. gün ile beraber düşük doz grubuna 5 gr/gün, yüksek doz grubuna 10 gr/gün canlı maya kültürü süt içerisinde verilmeye başlanılmıştır. Kontrol grubuna ise her hangi bir katkı verilmemiştir. Denemede kullanılan canlı maya kültürü canlı 12×10^{11} CFU/kg *Saccharomyces cerevisiae* kültürü ile taşıyıcı madde olarak kalsiyum karbonat ve kepek içerdiği garanti edilen ticari maya 25 kg'lık açılmamış paket olarak temin edilmiştir. Bütün gruplarda bulunan hayvanlara verilen süt miktarları aynı miktarlarda ve 55. güne kadar iki öğün halinde, sağılan günlük süttten alınarak süt hazırlama makinesinde 38 °C 'de verilmiştir. Verilen günlük süt miktarı, hayvanların yaşı dikkate alınarak; 0-7 günler arası 2 lt/öğün, 8-28 günler arası 2,5 lt/öğün, 29-42 günler arası 3 lt/öğün, 43-49 günler arası 2,5 lt/öğün, 50-53 günler arası 2 lt/öğün, 54-55 günler arası 1 lt tek öğün, 56. gün ise süt verilmemiştir. Yine süttten kesim stresini azaltmak amacı ile 57. gün arası 1 lt tek öğün, 58. gün süt verilmemiş, 59. gün arası 1 lt tek öğün süt verildikten sonra buzağular 60. günden itibaren süttten kesilmiştir. Süt besleme tablosu aşağıda belirtilmiştir. Sütle beslemeye ek olarak, su ve % 18 HP ve 2700 kcal/kg ME içeren buzağı başlangıç yemi 7. günden itibaren buzağulara ad libitum düzeyde verilmeye başlanmıştır. Kullanılan buzağı başlangıç yemine ait besin madde analiz sonuçları tablo1'de sunulmuştur. Yem 7-15. gün 500 gr/gün, 15-30. gün 1000 gr/gün, 30 -45. gün 1500 gr/gün, 45. günden itibaren süttten kesilene kadar ise 2000 gr/gün şeklinde günlük olarak yemliklere konulmuştur.

Buzağuların tüketmediği yemler günlük olarak tartılmak suretiyle alınmış, buzağuların günlük yem tüketimleri hesaplanarak kayıt altına alınmıştır. Yemlerin tartım işlemleri 5 gr hassasiyeti olan 40 kg kapasiteli elektronik terazi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün buzağuların doğum, 15, 30, 45 ve 60. günlerinde 50 gram hassasiyetli 1000 kg kapasiteli hayvan kantarı kullanılarak tartımları yapılmış ve kayıt altına alınmıştır. 60. gündeki tespit edilen canlı ağırlık aynı zamanda süttten kesim ağırlığı (SKA) olarak kayıt altına alınmıştır. Buzağuların sağlık durumları deneme boyunca günlük takip edilmiş olup, özellikle ishal olan buzağular tespit edilip kayıt altına alınmış ve süreç boyunca takip edilmiştir. İshal olan buzağulara standart olarak Baytril K %2.5 (Her ml sinde 25 mg Enrofloksasin içerir) ticari preparattan 2 ml IM olarak 3 gün, Fulimed (Her ml sinde 50 mg Fluniksine Meglumin içerir) ticari preparattan 2 ml IM olarak 3 gün uygulanmak suretiyle tedavileri gerçekleştirilmiştir.

Denemede kullanılan yem örneklerin kuru madde (KM), ham kül (HK), organik madde (OM), ve ham protein (HP) içerikleri AOAC (1990) analiz sistemine, nötral deterjan fiber (NDF), Van Soest ve Robertson (1979)'a göre, asit deterjan fiber (ADF) ise Goering ve Van Soest (1970)'e göre belirlenmiştir. Deneme sonunda bütün buzağılardan EDTA'lı tüplere kan alınarak hızlı bir şekilde Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya laboratuvarına ulaştırılmış ve bu kan örneklerinde kan hücre sayımı yapılmıştır. Denemede elde edilen veriler SAS istatistik programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş (SAS 1995) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar ise Duncan testi ile belirlenmiştir (Steel ve Torie 1980).

BULGULAR

Çalışmada kullanılan buzağı başlangıç yeminin besin madde içeriğine ilişkin veriler tablo 1'de, buzağuların canlı ağırlıklarına ait veriler Tablo 2'de, günlük canlı ağırlık artışı ve denede süresince toplan canlı ağırlık artışlarının ilişkin veriler Tablo 3'de sunulmuştur.

Çalışmada kullanılan buzağuların deneme süresince toplam yem tüketim verileri Tablo 4'de, ortalama günlük yem tüketim verileri Tablo 5 ve yemden yararlanma değerleri ise Tablo 6'da gösterilmiştir. Denemede kullanılan buzağılardan deneme sonunda alınan kan parametrelerine ait veriler Tablo 7'de, deneme süresince ishal görülme oranına ilişkin rakamlar ise Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 1. Buzağılara verilen buzağı başlangıç yeminin besin madde içeriği, (%KM'de).

Table 1. Nutrient composition of calf starter feed fed to calves, (DM%).

| | |
|-----|-------|
| KM | 93.06 |
| Kül | 7.34 |
| OM | 92.66 |
| NDF | 23.55 |
| ADF | 5.19 |
| CP | 19.26 |

Tablo 2. Denemede kullanılan buzağuların deneme süresince canlı ağırlık verileri, kg.

Table 2. Live weight values of calves used in the experiment throughout the experiment, kg.

| Canlı Ağırlık | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|----------------|------------|------------|------------|------|
| Doğum Ağırlığı | 41.58±2.16 | 42.42±1.61 | 41.17±3.24 | 0.72 |
| 15. Gün | 46.42±1.83 | 46.33±1.67 | 45.75±2.69 | 0.78 |
| 30. Gün | 57.58±2.35 | 58.50±2.31 | 57.67±3.04 | 0.74 |
| 45. Gün | 69.75±1.67 | 70.92±2.15 | 73.00±2.29 | 0.13 |
| 60. Gün | 81.50±3.11 | 84.58±3.17 | 85.58±3.59 | 0.14 |

Tablo 3. Denemede kullanılan buzağuların deneme süresince günlük ve toplam canlı ağırlık artış verileri, kg.

Table 3. Daily and total live weight gains of calves used in the experiment throughout the experiment, kg.

| Canlı Ağırlık Artışı, kg/g | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------|
| 0-15. Gün | 0.26±0.04 | 0.32±0.03 | 0.31±0.05 | 0.59 |
| 0-30. Gün | 0.53±0.04 | 0.54±0.04 | 0.55±0.02 | 0.94 |
| 0-45. Gün | 0.63±0.03 | 0.63±0.03 | 0.71±0.05 | 0.24 |
| 0-60. Gün | 0.67±0.03 | 0.70±0.04 | 0.74±0.03 | 0.31 |
| 0-90. Gün* | 0.74±0.09 | 0.81±0.08 | 0.79±0.06 | 0.82 |
| 15-30. Gün | 0.81±0.15 | 0.83±0.05 | 1.02±0.15 | 0.31 |
| 30-45. Gün | 0.78±0.16 | 0.91±0.11 | 0.84±0.11 | 0.44 |
| 45-60. Gün | 0.67±0.03 | 0.70±0.04 | 0.74±0.03 | 0.78 |
| Toplam Canlı Ağırlık Artışı, kg | 39.92±1.87 | 42.17±2.15 | 44.42±1.99 | 0.31 |

*İstatistiksel tahmini değerlerdir

Tablo 4. Denemede kullanılan buzağuların deneme süresince toplam yem tüketim verileri, gr.

Table 4. Total feed intake values of calves used in the experiment throughout the experiment, gr.

| Toplam Yem Tüketimi, gr | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------|
| 0-15. Gün | 715.83±141.54 | 526.67±75.21 | 644.17±168.47 | 0.61 |
| 15-30. Gün | 2776.67±618.24 | 2842.50±480.32 | 2847.50±516.89 | 0.99 |
| 30-45. Gün | 3901.67±570.67 | 4431.67±654.20 | 4154.17±663.48 | 0.84 |
| 45-60. Gün | 9541.67±1107.79 | 10238.33±1310.42 | 7595.00±1237.60 | 0.31 |
| 0-60. Gün | 16935.83±2226.32 | 18039.17±2405.41 | 15240.83±2152.58 | 0.68 |

Tablo 5. Denemede kullanılan buzağların deneme süresince günlük yem tüketim verileri, gr/gün.**Table 5.** Daily feed intake values of calves used in the experiment throughout the experiment, gr/d.

| Günlük Yem Tüketimi | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|------|
| 0-15. Gün | 47.72±9.44 | 35.11±5.01 | 42.94±11.23 | 0.61 |
| 15-30. Gün | 185.11±41.22 | 189.50±32.02 | 189.83±34.46 | 0.99 |
| 30-45. Gün | 260.11±38.04 | 295.44±43.61 | 276.94±44.23 | 0.84 |
| 45-60. Gün | 636.11±73.85 | 682.56±87.36 | 506.33±82.51 | 0.31 |
| 0-60. Gün | 282.26±37.11 | 300.65±40.09 | 254.01±35.88 | 0.68 |

Tablo 6. Denemede kullanılan buzağların deneme süresince yemden yararlanma verileri, gr yem/kg CAA.**Table 6.** Feed efficiency values of calves used in the experiment throughout the experiment, gr yem/kg LWG.

| Yemden Yararlanma gr/kg CAA | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|-----------------------------|----------------|--------------|---------------|------|
| 0-15. Gün | 158.82±39.89 | 140.58±14.90 | 177.67±66.84 | 0.85 |
| 15-30. Gün | 249.10±45.88 | 235.23±34.16 | 242.37±37.58 | 0.97 |
| 30-45. Gün | 420.46±116.88 | 361.55±56.15 | 300.52±58.00 | 0.60 |
| 45-60. Gün | 1180.06±431.57 | 748.44±29.09 | 640.04±122.47 | 0.32 |
| 0-60. Gün | 418.89±40.42 | 419.44±36.88 | 342.93±47.57 | 0.36 |

Tablo 7. Denemede kullanılan buzağların deneme sonu kan parametreleri.**Table 7.** Blood parameter of calves used in the experiment at the end of the experiment.

| | Kontrol | DCMK | YCMK | P |
|------|--------------|--------------|--------------|------|
| WBC | 8.47±0.67 | 8.56±0.51 | 9.29±0.57 | 0.57 |
| LYM | 5.62±0.45 | 5.45±0.26 | 5.35±0.15 | 0.83 |
| MON | 0.26±0.13 | 0.17±0.04 | 0.19±0.04 | 0.71 |
| NEU | 2.40±0.41 | 2.72±0.31 | 3.38±0.46 | 0.25 |
| EOS | 0.33±0.06 | 0.30±0.05 | 0.36±0.01 | 0.71 |
| BAS | 0.02±0.00 | 0.02±0.00 | 0.02±0.00 | 0.90 |
| LY% | 65.58±1.90 | 63.50±2.14 | 58.43±2.97 | 0.06 |
| MO% | 2.70±1.30 | 1.82±0.34 | 2.02±0.34 | 0.72 |
| NE% | 27.47±2.68 | 31.00±1.84 | 35.42±3.15 | 0.05 |
| EO% | 4.02±0.94 | 3.47±0.58 | 3.95±0.40 | 0.82 |
| BA% | 0.20±0.05 | 0.18±0.03 | 0.18±0.03 | 0.94 |
| RBC | 9.61±0.38 | 9.98±0.50 | 9.79±0.39 | 0.83 |
| HGB | 8.48±0.33 | 9.23±0.46 | 8.85±0.27 | 0.37 |
| HCT | 25.86±1.05 | 27.97±1.18 | 27.18±0.97 | 0.39 |
| MCV | 27.00±0.86 | 28.17±0.75 | 27.83±1.08 | 0.65 |
| MCH | 8.85±0.25 | 9.28±0.22 | 9.08±0.27 | 0.49 |
| MCHC | 32.73±0.46 | 32.97±0.35 | 32.57±0.35 | 0.77 |
| RDWc | 30.80±1.35 | 28.40±0.74 | 30.03±1.71 | 0.45 |
| PLT | 582.67±42.85 | 580.50±62.09 | 512.33±41.57 | 0.54 |
| PCT | 0.30±0.02 | 0.33±0.05 | 0.27±0.03 | 0.46 |
| MPV | 5.08±0.10 | 5.58±0.20 | 5.13±0.13 | 0.06 |
| PDWc | 29.08±0.96 | 31.40±0.94 | 29.40±1.38 | 0.31 |

Tablo 8. Buzağların İshale yakalanma % oranları.**Table 8.** Diarrhea prevalence of calves used in the experiment throughout the experiment, %.

| Grup | Toplam Hayvan Sayısı | İshale Yakalanan Hayvan Sayısı | İshal Olma Yüzdesi |
|------|----------------------|--------------------------------|--------------------|
| K | 6 | 5 | 83.33 |
| DCMK | 6 | 4 | 66.67 |
| YCMK | 6 | 2 | 33.33 |

TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt emme dönemindeki Simental ırkı buzağılara farklı miktarlarda canlı maya kültürü olarak verilen *Saccharomyces cerevisiae*'nin buzağı performans ve sağlığı üzerine etkilerini araştırıldığı bu çalışmada, buzağuların canlı ağırlık verileri Tablo 2'de verilmiştir. Söz konusu tablo incelendiğinde, denemeye alınan buzağuların doğum ağırlıkları birbirine yakın olup, istatistiksel ve kayda değer rakamsal farklılığın olmadığı görülmüştür. 15 ve 30. günlerde yapılan ölçümlerde canlı ağırlık artışları birbirine yakın iken, 45. günden itibaren canlı maya kültürü gruplarda istatistiksel olarak farklı olmamakla birlikte rakamsal canlı ağırlık artışı olduğu görülmüştür. Sütten kesme yaşı olan 60. güne gelindiğinde DDG 84.58 kg, YDG 85.58 kg ve KG 81.50 kg olarak ölçümleri gerçekleşmiştir. Çalışma sonunda DDG nin KG ye göre yaklaşık 3 kg, YDG ise KG'a göre 4 kg daha fazla canlı ağırlık aldığı tespit edilmiştir. Diler ve Aydın (2009) İsviçre Esmeri buzağularla yaptığı benzer bir çalışmada buzağuların doğum ağırlıklarının yaklaşık 39 kg ve 8 hafta sonunda sütten kesim ağırlıklarının ise kontrol grubu 67.8 kg canlı maya kültürü tüketen grubun ise 72.0 kg olduğunu ve gruplar arasında yaklaşık 4 kg fark olmasına rağmen farklılıklar istatistiksel olarak önemi bulunmadığı bildirilmiştir. Yine, Işık ve ark. (2004)'de Holştayn buzağularla yaptığı çalışmada, buzağuların doğum ağırlıklarının 34.0-39.8 kg, 2 ay sonunda ise canlı ağırlıklarının 64.0-72.0 kg aralığında olduğu, canlı maya kültürü verilen grubun canlı ağırlıklarının daha fazla olmasına karşın istatistiksel olarak benzer bulunduğu ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmadaki buzağuların gerek doğum ve gerekse 60 gün sonunda sütten kesim ağırlıkları yukarıda bahsedilen çalışmalardan daha yüksek olmakla birlikte, canlı maya kültürü kullanımının etkisi her iki çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Canlı ağırlıkların farklı oluşu kullanılan ırkların yapılarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Canlı ağırlık artışları değerlendirildiğinde 0-15., 0-30. ve 0-45. günler de gruplardaki canlı ağırlık artışlarının istatistiksel olarak önem arz etmediği görülmüştür. Günlük canlı ağırlık artışının 0-60. Günler arasında DDG 0.70 kg/g, YDG 0.74 kg/g ve KG 0.67 kg/g olarak hesaplanmıştır. YDG nin DDG ve KG ye göre, DDG'nin de KG'ye göre daha fazla günlük canlı ağırlık artışı sağladığı görülmüştür. Altmış günlük deneme sonunda, toplam canlı ağırlık artışı DDG 42.17 kg, YDG 44.42 kg ve KG 39.92 kg olarak belirlenmiştir. YDG nin KG'ye göre yaklaşık 4.5 kg ve DDG'ye göre ise 2 kg daha fazla canlı ağırlık artışı olduğu, DDG nin ise KG ye göre 2.2 kg'lık daha fazla canlı ağırlık artışı kazandığı görülmüştür. Bu kazanılan canlı ağırlıklar oransal olarak ele alındığında YDG'nin KG'ye göre %11.27, DDG'nin KG'ye göre ise %5.51 daha fazla canlı ağırlık artışı sağlandığı görülmektedir. Diler ve Aydın (2009) İsviçre Esmeri buzağularında 8 haftalık ortalama günlük canlı ağırlık artışının canlı maya kültürü grubunda 0.569 kg, kontrol grubunda 0.523 kg olup proiyotik grubunun, kontrol grubuna göre sırasıyla %6.2 ve %8.9 daha fazla üstünlük sağlamış olmasına karşın aradaki farklılık istatistiksel olarak önemi bulunamadığını ifade etmiştir. Yine Gill ve ark. (1987) 307 buzağıya 28 gün süre ile canlı maya kültürü verdiği denemede ortalama günlük canlı ağırlık artışının %9.3 daha fazla olduğunu ifade etmiştir. Mevcut çalışmada günlük canlı ağırlık artışlarının doz artışına paralel olarak %5.51 ile %11.21 düzeyinde artırdığı saptanmıştır. Jatkauskas ve Vrotniakiene (2010) Litvanya Alacası buzağularla yaptığı bir çalışmada, 62 günlük deneme süresinde kontrol grubundaki buzağular 40.1 kg

toplam canlı ağırlık kazanırken probiyotik tüketen buzağuların 47.9 kg canlı ağırlık kazandığını ve farklılığın istatistikselde önemli bulunduğu ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar literatür verileriyle uyum içindedir.

Denemede kullanılan buzağuların toplam yem tüketimleri; 0-15, 15-30, 30-45 ve 45-60. günler aralıklarındaki yem tüketimlerinin dönemsel olarak rakamsal farklılıklar arz ettiği ancak bu sayısal farklılıkların istatistiki açıdan önemli olmadığı görülmüştür. 0-60. günler arasında yani tüm deneme süresi boyunca toplam yem tüketimi DDG 18039.17gr, YDG 15240.83 gr ve KG 16935.83 gr olarak ölçülmüş ve bu veriler incelendiğinde YDG nin DDG ye göre yaklaşık 3 kg KG'ye göre ise 1.5 kg daha az yem tüketmesine rağmen daha fazla canlı ağırlık artışı kazandığı belirlenmiştir. Günlük ortalama yem tüketimleri 0-15., 15-30., 30-45. günler de ölçülen günlük yem tüketimleri gruplar bazında birbirine yakın, 45-60. arasında DDG nin en fazla günlük yem tüketimine sahip olduğu YDG'nin KG'den 130 gr/gün DDG den ise 174 gr/gün daha az yem tükettiği görülmüştür. Deneme süresi boyunca ortalama günlük ortalama yem tüketimleri ise DDG 300.65 gr/gün, YDG 254,01 gr/gün ve KG 282.26 gr/gün olarak belirlenmiştir. Söz konusu veriler incelendiğinde DDG'nin KG'ye göre yaklaşık 18 gr/gün fazla olduğu, YDG'nin ise KG'ye göre 28 gr/gün az olduğu görülmüştür. Işık ve ark. (2004) da Holştayn buzağuların ikinci ayda ortalama 615-759 gr/gün yem tükettiklerini ifade etmiştir. Söz konusu çalışmada, 0-60 günler ortalaması 300 gr civarında olup çok düşüktür. Ancak, 45-60. günler arası ortalama yem tüketim değerleri Işık ve ark. (2004) bildirdiği değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Mevcut çalışma sonuçlarına benzer olarak, yapılan çalışmalarda canlı maya kültürü kullanımının yem tüketimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını ifade edilmiştir Gill ve ark. 1987; Diler ve Aydın 2009).

Yemden yararlanma verilerine göre KG 45-60. günler arasında 1 kg canlı ağırlık artışı sağlamak için 1180 gr yem tükettiği KG ye göre DDG nin 432 gr, YDG nin ise 540 gr daha az yem tükettiği hesaplanmıştır. 0-15, 15-30 ve 30-45. günlerde sayısal farklılıkların olduğu ancak bu farklılıkların istatistiki açıdan önemli olmadığı görülmüştür. Deneme süresi boyunca ortalama yemden yararlanma değerleri ise DDG 419.44 gr yem/kg CAA., YDG 342.93 gr yem/kg CAA. ve KG 418.89 gr yem/kg CAA olarak belirlenmiştir. KG ve DDG arasında yemden yararlanma açısından farklılık görülmeyip YDG nin 1 kg canlı ağırlık artışı için her iki gruba göre yaklaşık 80 gr daha az yem tükettiği görülmüştür. Buda yaklaşık olarak %19.05'lik daha az bir yem tüketimi anlamına gelmektedir. Işık ve ark. (2004) yapmış olduğu bir çalışmada canlı maya kültürü kullanımının buzağularda yemden yararlanma değerini %11.05 oranında iyileştirdiği ifade edilmiştir. Yine benzer şekilde canlı maya kültürü kullanımının yemden yararlanmayı %5.6 (Hooper 1990) ve %9.5 (Gill ve ark. 1987) iyileştirdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Mevcut çalışmada canlı maya kültürünün etkisi literatür bildirimleriyle uyumlu olmakla birlikte istatistiksel fark tespit edilememiştir. Bunun en önemli sebebi mevcut çalışmada kullanılan buzağı sayısının biraz az olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Canlı maya kültürü kullanımının yararlarını gösteren birçok çalışmanın olmasına karşın, canlı maya kültürü kullanımının buzağularda istatistiksel olarak önemli bir etkisinin tespit edilemediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Alp ve Kahraman 1996). Bu tür birbirinden farklı sonuçların ortaya çıkışı; kullanılan canlı maya kültürülerin farklılığı, denemede kullanılan hayvanların ırk-yaş-cinsiyet farklılığı, farklı çevre şartları

ve uygulanan bakım-besleme programlarına kadar değişik birçok faktörün etkili olabileceğini göz önünde bulundurulmalıdır.

Kan analiz sonuçları değerlendirildiğinde tam kan parametrelerinin tüm gruplarda referans değer aralıklarında olduğu ve bu değerlerin istatistiksel açıdan önem arz eden farklılıklar olmadığı görülmüştür. Kan hücrelerinden lenfosit oranı katılan katkı oranına paralel olarak azalırken nötrofil oranının (P=0.05) ise lineer olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Buda, NE% ve LY% nin (P = 0.05) istatistiksel öneme yakınlığından dolayı canlı maya kültürü tüketiminin immün sistem üzerine etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Denemede kullanılan buzağular arasında hiçbir ölüm görülmemiştir. Deneme süreci boyunca DDG den 4 adet, YDG den 2 adet KG den 5 adet buzağı ishal olmuştur. Hayvan sayılarına oranlandığı da isal görülme oranı KG'da %83.33, DDG'da %66.67 ve YDG'da ise %33.33 olarak hesaplanmıştır. Buda canlı maya kültürü kullanımının buzağularda isal görülme sıklığını ciddi anlamda azalttığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar, buzağularda canlı maya kültürü kullanımının ishal vakalarını önlediği ve ishal olma sıklığını azalttığını ortaya koyduğu görülmektedir (Gill ve ark. 1987; Abe ve ark. 1995; Işık ve ark. 2005; Aydın ve ark. 2008; Diler ve Aydın 2009).

Sonuç olarak, süt buzağularına verilen mayanın istatistiksel olarak olmasa da canlı ağırlık artışı, yemden yaranmayı, buzağı sağlığını iyileştirdiği ve immün sistem üzerine de olumlu etkisi olabileceği kanaati oluşmuştur. Kullanılan mayanın daha fazla buzağı kullanılarak daha detaylı olarak etkilerinin araştırılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

Abe F, Ishibashi N, Shimamura S (1995). Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci*, 78, 2838-2846.

- Alp M, Kahraman R (1996).** Canlı maya kültürlerinin hayvan beslemede kullanılması. *İst Üniv Vet Fak Derg*, 22(1), 1-8.
- Anonim (2016).** Hayvancılık akademisi. <http://hayvancilikakademisi.com/hayvancilik/surulerdeki-en-onemli-sinirlendirici-etken-buzagi-olumlari>. Erişim Tarihi: 01.08.2016.
- AOAC (1990).** Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th Ed., Washington, DC.
- Aydın R, Diler A, Yanar M, Koçyigit R, Ozkılıcı T (2008).** The effect of direct fed microbials plus enzymes supplement on the growth performance of Holstein Friesian calves. *J Anim and Vet Adv*, 7(4), 516-519.
- Diler A, Aydın R (2009).** Rasyona canlı maya kültürü – enzim kombinasyonu ilavesinin İsviçre esmeri ırkı buzağularda büyüme performansı ve yemden yararlanma ve sağlık üzerine etkileri. *Hayvansal Üretim*, 50(2), 22-28.
- Gill DR, Smith RA, Ball RL (1987).** The effect of probiotics feeding on health and performance of newly arrived stocker calves. *Anim Sci Res Rep*, 119, 202-204.
- Goering HK, Van Soest PJ (1970).** Forage Fiber Analyses. Apparatus, Reagent, Procedures and Applications. USDA Agric. Handbook No.379.
- Işık M, Ekimler F, Özen N, Fırat MZ (2004).** Canlı maya kültürü kullanımının buzağı büyüme performansı ve sağlığı üzerine etkileri. *Türk J Vet Anim Sci*, 28(1), 63-69.
- Jatkauskas J, Vrotniakiene V (2010).** Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. *Veterinari Medicina*, 55(10), 494-503.
- SAS (1995).** Statistical Analysis Software, Programme User Guide. Statistics 5 ed., SAS Inst., Inc. Carry, NC.
- Saygıcı A, Günel M (2004).** Farklı düzeylerde protein içeren yumurta tavuğu rasyonlarına canlı maya kültürü ilavesinin performans ve bazı yumurta kriterleri üzerine etkileri. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Isparta.
- Steel RG, Torrie JH (1980).** Principle and Procedures of Statistics. 2. ed., Mc Donald book Co., Inc., New York, NY.
- Şahal M, Ceylan E, Terzi OS, Kara E (2017).** Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. Buzağı Kayıplar Sempozyumu, Kırıkkale, s. 51.
- Van Soest PJ, Robertson JB (1979).** Systems Of Analyses For Evaluation Of Fibrous Feed. In, Pigden WJ, Balch CC And Graham M (Eds.): Proc. Int. Workshop On Standardization of Analytical Methodology For Feeds. Int. Dev. Res. Center, Ottawa, Canada, pp. 49-60.



Macroanatomical and Morphometric Investigation of Mandibula in Aksaray Malaklı Dogs

Ramazan İLGÜN^{ID} Zekeriya ÖZÜDOĞRU^{ID}

Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Aksaray, Turkey

Received: 15.03.2019

Accepted: 04.12.2019

ABSTRACT

In this investigation, mandible of 5 adult Aksaray Malaklı dogs, regardless of gender, aged between 4 and 5 years, who died from various reasons, brought to Aksaray University Veterinary Faculty Veterinary Health and Application and Research Center by Aksaray Malaklı dog breeders between 2016-2018, were used. After determining the macroanatomical features of the study, morphometric investigations were measured with the help of digital caliper and the data were analyzed with arithmetic mean and standard error. The ramus ventralis convex. The facies labialis was convex, the facies lingualis in carnivora showed a sharp concavity in accordance with the language structure. It was found that the linea mylohyoidea S'line in corpus mandibulae was markedly folded. There were 2 foramen mentale in the corpus mandibulae. The jaw tooth formula was I3 C1 P4 M3. The length of the mandibulae was measured as 187.33 mm and the height of the ramus mandible was 75, 09 mm. As a result, in this study macroanatomical and morphometric features of Aksaray Malaklı dog mandible were examined, and similarities and differences with other carnivore species were determined.

Keywords: *Aksaray Malaklı Dog, Mandible, Morphometric*

ÖZ

Aksaray Malaklı Köpeklerinde Mandibula'nın Makro-Anatomik ve Morfometrik Olarak İncelenmesi

Çalışmada 2016-2018 yılları arasında Aksaray Malaklı köpeği yetiştiricileri tarafından Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Sağlık ve Uygulama ve Araştırma Merkez'ine getirilen çeşitli sebeplerden ölmüş, cinsiyet farkı gözetmeksizin 4 ile 5 yaşlar arasında değişen toplam 5 adet erişkin Aksaray Malaklı köpeğinin mandibula'ları kullanıldı. Araştırmada mandibula'nın makroanatomik özellikleri belirlendikten sonra morfometrik incelemeleri digital kumpas yardımıyla ölçülerek incelemeye ait veriler aritmetik ortalama ve standart hata ile gösterildi. Corpus mandibulae'nın margo ventralis'inin dışbükey olduğu tespit edildi. Corpus mandibulae'da facies labialis'in dışbükey, facies lingualis'in carnivor dil yapısına uygun olarak keskin bir içbükeylik gösterdiği saptandı. Corpus mandibulae'da yer alan linea mylohyoidea'nın "S" şekline benzer belirgin bir kıvrım gösterdiği ve corpus mandibulae'da materyallerin tamamında 2 adet foramen mentale'nin bulunduğu belirlendi. Alt çene diş formülünün I3 C1 P4 M3 şeklinde olduğu tespit edildi. Yapılan ölçümlerde mandibulae'sının uzunluğu 187,33 mm ve ramus mandibula'nın yüksekliği ise 75,09 mm olarak ölçüldü. Sonuç olarak, Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının makroanatomik ve morfometrik özellikleri incelenerek diğer carnivor türleriyle olan benzerlik ve farklılıkları ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Aksaray Malaklı Köpeği, Mandibula, Morfometrik*

GİRİŞ

Malaklı köpeği ırkının anavatanı Aksaray ili ve çevresidir. Bölgede yoğun olarak yetiştirilmesi nedeniyle "Aksaray Malaklısı" da denilmektedir. Yapılan genetik çalışma ve analizler sonucunda Akbaş, Kars ve Kangal çoban köpeklerinden genetik benzerlik bakımından ayrı bir grup oluşturduğu için farklı bir ırk olabileceği belirtilmiştir (Atasoy ve Kanlı 2005, Atasoy 2011, Atasoy ve ark. 2011). Aksaray Malaklı köpeği boz renkli, iri yapılı ve dudakları sarkık bir yapıya sahiptir. Çoğunlukla karşılaştırıldığı

Kangal köpeğine göre pençeleri daha büyük ve kalın yapıda olduğu, fakat sürü yönetiminde zayıf, soğuğa karşı dayanıksız, sarkık dudaklı yapısı nedeniyle suya salyalarının aktığı ve sürü peşinde çabuk yorgun düştükleri belirtilmektedir (Yılmaz 2008, Atasoy 2011, Atasoy ve ark. 2011, Yılmaz ve Ertuğrul 2012, Atasoy ve ark. 2014, Oğrak ve ark. 2018). Evcil köpek (Evans 1979, Nickel ve ark. 1987, Dursun 1994), gri kurt (Atalar ve Temizer 2009), sansar (Atalar ve Temizer 2009), vaşak (Atalar ve Temizer 2009), tilki (Atalar ve Temizer 2009), Alman kurt köpeği (Onar ve ark.1999), porsuk (Atalar ve

Temizer 2009), su samuru (Karan ve ark. 2005), rakun köpeği (Hidaka ve ark. 1998, Korablev ve), Nijerya yerel köpeği (Igado 2017) gibi carnivorların mandibula'sı üzerinde incelemeler yapıldığı tespit edilirken, Aksaray Malaklı köpeğinde mandibula kemiğinin makroanatomi ve morfometrisi ile ilgili bilimsel bir çalışmanın yapılmamış olması, makroanatomik ve morfometrik yapısı ile ilgili yapılacak araştırmalara kaynak oluşturması açısından önemlidir. Carnivorlar'da mandibula kemiği özellikle avın yakalanması ve parçalanması sırasında baş ve boyuna yardımcı olması nedeniyle önemli anatomik bir yapıdır. Bu çalışmada, Aksaray Malaklı köpeğinin mandibula'sının makro-anatomik ve morfometrik özelliklerini tespit etmek ve diğer etçillerle arasındaki benzerlik ve farklılıkları ortaya koyarak literatür bilgisine katkı sağlamak amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada 2016-2018 yılları arasında Aksaray Malaklı köpeği yetiştiricileri tarafından Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Sağlık ve Uygulama ve Araştırma Merkezine teşhis ve analiz amacıyla getirilen çeşitli sebeplerden ölmüş, cinsiyet farkı gözlemlenmeden 4 ila 5 yaş aralığında olan 5 adet erişkin Aksaray Malaklı köpeğinin mandibula'ları incelendi. Mandibula'ların maserasyonu, maserasyon tekniklerine uygun olarak gerçekleştirildi (Taşbaş ve Tecirlioğlu 1966). Maserasyondan sonra Malaklı köpeği mandibula'ları incelendi ve fotoğraf makinasıyla (Canon CE 500, Japan) makroanatomik yapıları görüntülendi. Uzunluk ölçümleri dijital kumpas (A marka, 200 mm'lik), açı ölçümleri açıölçer (Ruby, 90x15 mm'lik) kullanılarak yapıldı. İncelemeye ait veriler aritmetik ortalama ve standart hata

Tablo 1. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının ortalama ve standart sapma değerleri

Table 1. The mean and standard deviation values of the Aksaray Malaklı dog mandible

| Ölçüler | Aksaray Malaklı köpeği Aritmetik ortalama \pm SP / mm |
|--|---|
| Processus condylaris'ten infradental'e olan toplam uzaklık | 187.33 \pm 14.44 |
| Processus angularis'den infradental'e olan uzaklık | 183.916 \pm 13.61 |
| Processus condylaris ile processus angularis arasındaki çentikten infradental'e olan uzaklık | 176.17 \pm 13.56 |
| Processus condylaris'den dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklığı | 162.40 \pm 13.07 |
| Processus condylaris ile processus angularis arasındaki çentikten dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık | 152.80 \pm 13.21 |
| Processus angularis'den dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık | 158.21 \pm 9.70 |
| 4. Premolar dişin aboral kenarından dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık | 58.97 \pm 5.87 |
| 4. Premolar dişin aboral'inden corpus mandibulae'nin yüksekliği | 32.68 \pm 6.01 |
| Ramus mandibulae'nin yüksekliği | 75.09 \pm 11.18 |
| Premolar dişleri arasındaki uzaklık | 51.25 \pm 2.57 |
| Molar dişler arasındaki uzaklık | 41.53 \pm 1.36 |

Tablo 2. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının açıları

Table 2. The angles of the Aksaray Malaklı dog mandible

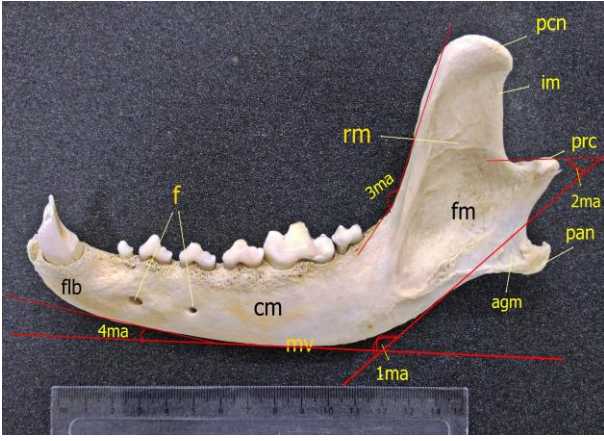
| Açılar | Aksaray Malaklı köpeği Aritmetik ortalama \pm SP / mm |
|--|---|
| Corpus mandibulae'nin margo ventralis'i ile ramus mandibulae'nin margo caudalis'i arasındaki açı | 154.75 \pm 3.80 |
| Processus condylaris'in tuber mandibulae'si ile ramus mandibulae'nin margo caudalis'i arasındaki açı | 27.24 \pm 2.36 |
| Ramus mandibulae ile pars molaris corporis mandibulae'nin margo alveolaris'i arasındaki açı | 146.93 \pm 5.03 |
| Corpus mandibulae'nin margo ventralis'inin ön kısmının yaptığı açı | 35.49 \pm 3.17 |
| İki corpus mandibulae arasındaki açı | 29.10 \pm 1.91 |

ile gösterildi (Tablo 1 ve 2). Terminolojik ifadelerin yazımında Nomina Anatomica Veterinaria (2012) esas alındı.

BULGULAR

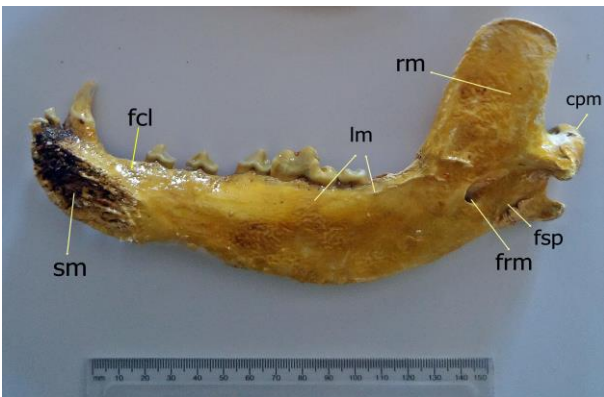
Mandibula'nın ventral kısmını corpus mandibulae, dorsal kısmını ise ramus mandibulae oluşturduğu gözlemlendi. Synchronosis intermandibularis tam birleşme durumu göstermekteydi. Symphysis mandibulae pürüzlü kabartı görünümündeydi. Corpus mandibulae'nin margo ventralis'i dışbükey vaziyette tespit edildi. Corpus mandibulae'da facies labialis dışbükey, facies lingualis carnivor dil yapısına uygun olarak keskin bir içbükeylik göstermekteydi. Corpus mandibulae'da yer alan linea mylohyoidea'nın "S" şekline benzer belirgin olarak kıvrım gösterdiği ve corpus mandibulae'nin caudal'indeki fossa pterygoidea'nın sığ durumda olduğu tespit edildi. Foramen mentale delikleri 2 adet bulunmaktaydı (Şekil 1 ve 3). Altçene diş formülü I3 C1 P4 M3 şeklinde idi. Ramus mandibulae'nin medial'indeki foramen mandibulae geniş bir delik durumunda gözlemlendi. Ramus mandibulae'daki processus coronoideus geniş ve geriye doğru yönelmekte iken processus condylaris'in caput mandibulae'si kalın, dışbükey bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Angulus mandibulae'daki processus angularis yassı bir çıkıntı şeklinde caudal'e dönük olarak tespit edildi. Ayrıca, angulus mandibulae'daki fossa masseterica'nın oldukça derin olduğu gözlemlendi (Şekil 1-4). Mandibula'nın morfometrik ölçümleri Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Bu ölçümlere göre processus condylaris'ten infradental'e olan toplam uzaklık 187,33 \pm 14,44 mm ve ramus mandibulae'nin yüksekliği 75,09 \pm 11,18 mm olarak tespit edildi.

Tablo 1. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının ortalama ve standart sapma değerleri



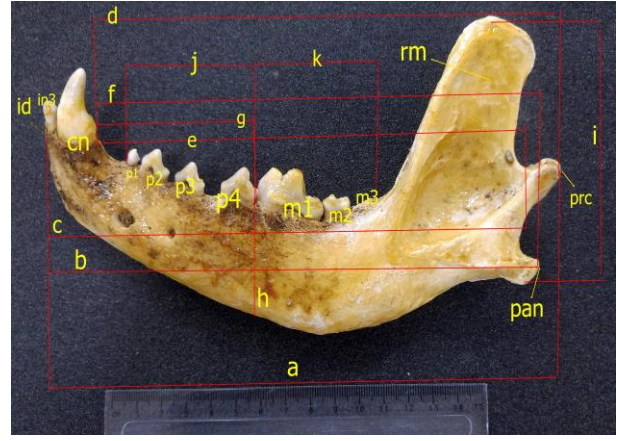
Şekil 1. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sı lateral görünümü. **flb.** Facies labialis, **cm.** Corpus mandibulae, **f.** Foramen mentale, **mv.** Margo ventralis, **agm.** Angulus mandibulae, **pan.** Processus angularis, **prc.** Processus condylaris, **pcn.** Processus coronoideus, **im.** İncisura mandibulae, **rm.** Ramus mandibulae, **fm.** Fossa masseterica, **1ma.** The angle between the margo ventralis of the corpus mandible and the margo caudalis of the ramus mandible, **2ma.** The angle between tuber mandible of processus condylaris and margo caudalis of ramus mandible, **3ma.** Ramus mandibulae ile pars molaris corporis mandibulae'nin margo alveolaris'i arasındaki açı, **4ma.** The angle of the anterior portion of the margo ventralis of the corpus mandible.

Figure 1. Lateral view of mandible in Aksaray Malaklı dog. **flb.** Facies labialis, **cm.** Corpus mandibulae, **f.** Foramen mentale, **mv.** Margo ventralis, **agm.** Angulus mandibulae, **pan.** Processus angularis, **prc.** Processus condylaris, **pcn.** Processus coronoideus, **im.** İncisura mandibulae, **rm.** Ramus mandibulae, **fm.** Fossa masseterica, **1ma.** The angle between the margo ventralis of the corpus mandible and the margo caudalis of the ramus mandible, **2ma.** The angle between tuber mandible of processus condylaris and margo caudalis of ramus mandible, **3ma.** Ramus mandibulae ile pars molaris corporis mandibulae'nin margo alveolaris'i arasındaki açı, **4ma.** The angle of the anterior portion of the margo ventralis of the corpus mandible.



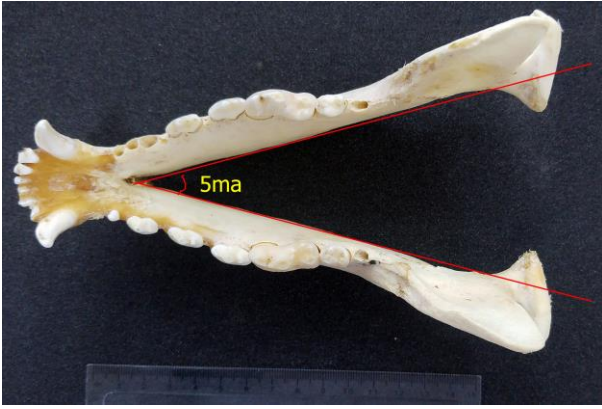
Şekil 2. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sı medial görünümü. **sm.** Synchondrosis mandibulae, **lm.** Linea mylohyoidea, **rm.** Ramus mandibulae, **frm.** Foramen mandibulae, **fsp.** Fossa pterygoidea, **cpm.** Caput mandibulae, **fcl.** Facies lingualis.

Figure 2. Medial view of mandible in Aksaray Malaklı dog. **sm.** Synchondrosis mandibulae, **lm.** Linea mylohyoidea, **rm.** Ramus mandibulae, **frm.** Foramen mandibulae, **fsp.** Fossa pterygoidea, **cpm.** Caput mandibulae, **fcl.** Facies lingualis.



Şekil 3. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sı ölçümleri. **id.** Infradental, **cn.** Canin, **in3.** 3.Incise, **p1.** 1.Premolar diş, **p2.** 2.Premolar diş, **p3.** 3.Premolar diş, **p4.** 4.Premolar diş, **p5.** 5. Premolar diş, **m1.** 1. Molar diş, **m2.** 2.Molar diş, **m3.** 3.Molar diş, **rm.** ramus mandibulae, **prc.** Processus condylaris, **pan.** Processus angularis. **a.** Processus angularis ile infradental'e olan toplam uzaklık, **b.** Processus angularis'den infradental'e olan uzaklık, **c.** Processus condylaris ile processus angularis arasındaki çentikten infradental'e olan uzaklık, **d.** Processus condylaris'den dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklığı, **e.** Processus condylaris ile processus angularis arasındaki çentikten dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık, **f.** Processus angularis'den dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık, **g.** 4. Premolar dişin aboral kenarından dens caninus'un alveol'ünün aboral kenarına olan uzaklık, **h.** 4. Premolar dişin aboral'inden corpus mandibulae'nin yüksekliği, **i.** Ramus mandibulae'nin yüksekliği, **j.** Premolar dişleri arasındaki uzaklık, **k.** Molar dişler arasındaki uzaklık.

Figure 3. Measurements of mandible in Aksaray Malaklı dog. **id.** İnfra dental, **cn.** Canin, **in3.** 3.Incise, **p1.** 1.Premolar, **p2.** 2.Premolar, **p3.** 3.Premolar diş, **p4.** 4.Premolar, **p5.** 5. Premolar, **m1.** 1. Molar, **m2.** 2.Molar, **m3.** 3.Molar, **rm.** ramus mandibulae, **prc.** Processus condylaris, **pan.** Processus angularis. **a.** Total distance to infradental with processus angularis, **b.** Distance from processus angularis to infradental **c.** The distance from the notch between the processus condylaris and the processus angularis to the infradental, **d.** The distance of the dens caninus from the processus condylaris to the aboral edge of the alveoli, **e.** The distance from the notch between the processus condylaris and the processus angularis to the aboral edge of the alveoli of the dens caninus, **f.** The distance from the processus angularis to the aboral edge of the alveolus of the dens caninus, **g.** 4. The distance from the aboral edge of the premolar tooth to the aboral edge of the alveolus of the dens caninus, **h.** 4. The height of the corpus mandible from the aboral of the premolar tooth, **j.** Distance between premolar teeth, **k.** Distance between molar teeth



Şekil 4. Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sı dorsal görünümü. **5ma.** İki corpus mandibulae arasındaki açı.

Figure 4. Dorsal view of mandible in Aksaray Malaklı dog. **5ma.** The angle between the two corpus mandibulae.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Evans (1979), Nickel (1987), Dursun (1994) köpek mandibula'sında synchondrosis intermandibularis'in tam birleşme gösterdiğini ve mandibula'nın corpus ve ramus kısımlarından oluştuğunu ifade etmişlerdir. Aksaray Malaklı köpeğinde de benzer durumda gözlemlendi.

Literatür bilgilerinde corpus mandibulae'nın margo ventralis'i rakun köpeği (Hidaka ve ark. 1998), porsuk (Karan ve ark. 2005) ve su samurunda (Karan ve ark. 2005) düz, köpek (Dursun 1994), kurt (Atalar ve Temizer 2009), tilki (Atalar ve Temizer 2009) ve sansarda (Atalar ve Temizer 2009) dışbükey vaziyette olduğu rapor edilmiştir. Aksaray Malaklı köpeğinde de köpek, kurt, tilki ve sansar da olduğu gibi corpus mandibulae'nın margo ventralis'i dışbükey olarak saptandı.

İncelenen literatür bilgilerinde porsuk (Karan ve ark. 2005), sansar (Atalar ve Temizer 2009), köpekte (Dursun 1994) iki adet, vaşak (Atalar ve Temizer 2009), kurt (Atalar ve Temizer 2009), tilkide (Atalar ve Temizer 2009) üç adet, su samurunda (Karan ve ark. 2005) beş adet foramen mentale'nin bulunduğu bildirilmektedir. Araştırma materyalinde porsuk, sansar ve köpektaki gibi iki adet foramen mentale bulunmaktaydı.

Karan ve ark. (2005) su samuru, porsuk ve kedide linea mylohyoidea'nın belirsiz, köpek ve sansarda ise az belirgin olarak mandibula'nın medial yüzü boyunca longitudinal uzanan bir çizgi şeklinde, Atalar ve Temizer (2009) ise vaşak ve sansarda az belirgin iken, kurt ve tilkide ise silik durumda olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma materyalimiz olan Aksaray Malaklı köpeğinde linea mylohyoidea'nın belirgin bir durumda olduğu ve "S" şekline benzer kıvrım gösterdiği tespit edildi.

Yapılan literatür araştırmalarında alt çene diş formülleri için Karan ve ark.(2005) porsukta I3 C1 P3 M2, su samurunda I3 C1 P3 M2, sansarda I3 C1 P3 M2, köpekte I3 C1 P4 M3 ve kedide I3 C1 P2 M1 şeklinde olduğunu bildirmişler, Atalar ve Temizer (2009) kurtta I3 C1 P4 M3; tilkide I3 C1 P4 M3, vaşakta I3 C1 P2 M1 formülü olarak ifade etmişlerdir. Aksaray Malaklı köpeğinde alt çene diş formülü tilki, köpek ve kurdun diş formülüne benzer şekilde I3 C1 P4 M3 olarak tespit edildi.

Araştırmacılar Evans (1979), Nickel (1987), Dursun (1994), Karan ve ark.(2005) processus coronoideus'un tüm türlerde geniş olduğunu ve çıkıntının sansar, su samuru, kurt ve tilkide yukarı; vaşak, kedi, köpek ve porsukta ise geriye doğru yöneldiğini rapor etmişlerdir.

Aksaray Malaklı köpeğinde de literatür bilgileriyle uyumlu olarak geniş bir şekilde olduğu ayrıca, vaşak, kedi, köpek ve porsuktaki gibi geriye doğru yöneldiği gözlemlendi.

Dursun (1994) köpeklerde processus condylaris'in caput mandibulae'sının dışbükey bir yapıya sahip olduğunu bildirmektedir. Aksaray Malaklı köpeğinde benzer şekilde dışbükey bir yapıya sahip olmakla birlikte kalınlaşmış bir yapı olarak tespit edilmiştir.

Araştırmacılar Dursun (1994), Karan ve ark.(2005) processus angularis'in köpekte iyi gelişmiş durumda olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma materyalimiz de iyi gelişmiş yassı bir çıkıntı olarak tespit edildi. Atalar ve Temizer (2009) kurtta processus angularis'in altında incisura vasorum facialium'un belirgin olduğunu ifade etmektedirler. Aksaray Malaklı köpeğinde incisura vasorum facialium belirgin değildi.

Mandibulae'nın uzunluğu ile ilgili rakun (Hidaka ve ark. 1998) 86,11 mm; tilki (Korablev ve Szuma 2013) 108 mm; Nijeryanın yerel köpekleri (Igado 2017) 114,6 ve Alman Kurt köpeğinde (Onar ve ark. 1999) 92,58 mm olarak bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının uzunluğu 187,33 mm dir.

Sunulan bu çalışmada Aksaray Malaklı köpeği ramus mandibulae'sının yüksekliği 75,09±11 mm olarak ölçülmüştür. Bu değer ile ilgili rakun (Hidaka ve ark. 1998) 48,66; tilkide (Figueirido ve ark. 2011, Munkhzull ve ark. 2018) 37,01; Alman kurt köpeğinde (Onar ve ark. 1999) 31,38 mm olarak ölçülmüştür. Bu ölçümlere göre Aksaray Malaklı köpeğinin ramus mandibulae'sının yüksekliğinin yukarıda bildirilen türlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan açı ölçümlerinde corpus mandibulae'nın margo ventralis'i ile ramus mandibulae'nın margo caudalis'i arasındaki açı 154,75±3,80° iken corpus mandibulae'nın margo ventralis'inin ön kısmının yaptığı açı 35,49±3,17° dir. Onar ve ark.(1999) Alman kurt köpeğinde bu değerlerin sırasıyla 138,26° ve 15,49° olarak bildirmişlerdir. Bu değerlere göre Aksaray Malaklı köpeği'nin corpus mandibulae'nın margo ventralis kenarının Alman kurt köpeğinkinden daha dışbükey olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, Aksaray Malaklı köpeği mandibula'sının makro-anatomik ve morfometrik özellikleri incelenerek önemli bulgular saptandı. Sansar, su samuru, tilki, Alman kurt köpeğinde, gri kurt, köpek, kedi, vaşak gibi carnivorların mandibula yapısına benzerlikler göstermesi yanında bazı farklı anatomik özellikler de taşımaktadır. Bu çalışmanın Aksaray Malaklı köpeği ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Atalar Ö, Temizer A (2009).** Vaşak, sansar, tilki, ve kurtta, ossa facie'nin karşılaştırmalı anatomisi. *Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg*, 23(2),107-110.
- Atasoy F, Kanlı O (2005).** Türk çoban köpeği kagal. 2. Baskı, No: 60, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Atasoy F (2011).** Türk Mastifi köpeklerin morfolojik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi ve bu köpeğin tanıtılması. 1. Baskı, Medisan Matbaacılık, Ankara.
- Atasoy F, Uğurlu M, Özarslan B, Yakan A (2011).** Halk elinde yetiştirilen Akbaş köpeklerinde canlı ağırlık ve vücut ölçüleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 58, 213-215.
- Atasoy F, Erdoğan M, Özarslan B, Yüceer B, Kocakaya A, Akçapınar H (2014).** Malaklı Karabaş köpeklerde bazı morfolojik ve genetik özellikler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 125-132.
- Dursun N (1994).** Veteriner Anatomi 1. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, 95-107.
- Evans HE (1979).** Christensen Miller's Anatomy of the Dog, Second Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 139-144.

- Figueirido B, Perez-Claros JA, Hunt RM, Palmqvist P (2011).** Body mass estimation in amphicyonid carnivoran mammals: A multiple regression approach from the skull and skeleton. *Acta Palaeontol Pol*, 56(2), 225-246.
- Hidaka S, Matsomoto M, Hiji H, Ohsako S, Nishinakagaw H (1998).** Morphology and morphometry of skulls of racoon dogs, *Nyctereutes procynoides* and badgers, *Meles meles*. *J Vet Med Sci*, 60(2),161-167.
- Igado OO (2017).** Skull Typology and Morphometrics of the Nigerian local dog (*Canis lupus familiaris*) Niger. *J Physiol Sci*, 32, 153-158.
- Karan M, Aydın A, Timurkaan S, Toprak B (2005).** Bazı carnivorlarda viscerocranium 'un karşılaştırmalı makro-anatomik incelemeler. *Fırat Univ Sağ Bil Tıp Derg*, 19 (2), 99-102.
- Korablev NP, Szuma E (2013).** Variability of native and invasive raccoon dogs' *Nyctereutes Procynoides* populations: looking at translocation from a morphological point of view. *Acta Theriol*, 38(2), 146.
- Munkhzull T, Reading RP, Buuveibaatar B, Murdoch JD (2018).** Comparative craniometric measurements of two sympatric species of vulpes in ikh nart nature reserve, Mongolia. *Mong J Biol Sci*, 16 (1), 19-28.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1987).** The Anatomy of the domestic animals. Vol. 1 Berlin: *Verlag paul parey*, 113-125.
- Nomina Anatomica Veterinaria (2012).** International committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 5th Edition (revised version). Publishing by the Editorial Committee Hannover (Germany), Columbia, MO (U.S.A.), Ghent (Belgium), Sapporo (Japan).
- Oğrak YZ, Öztürk N, Akın D, Özcan M (2018).** Comparison various body measurements of Aksaray malaklı and kangal dogs. *J Fac Vet*, 2(3), 86-91.
- Onar V. Kahveciođlu O, Mutuş R., Alpak H (1999).** Alman kurt köpeklerinde mandibula'nın morfometrik analizi. *Türk J Vet Anim Sci*, 23(2), 329-334.
- Taşbaş M, Tecirlioğlu S (1966).** Maserasyon tekniği üzerinde araştırmalar. *J Fac Vet Med*, Ankara, 12, 324-30.
- Yılmaz O (2008).** Türk kangal (Karabaş) Köpeği 4.Baskı. İstanbul: Bilge Kültür Sanat Yayın.
- Yılmaz O, Ertuğrul M (2012).** Türkiye yerli köpek ırk ve tipleri. *Iğdır University Journal of the Institute Science and Technology*, 2(1), 99-106.



First Isolation of *Salmonella enterica* Serotype Newport (Sn) From Land Turtles (*Testudo Graeca Ibera*) Cultured in Turkey

Meriç Lütü AVSEVER¹

¹ Aksaray University, Eskiil Vocation of High School, Laboratory and Veterinary Sciences, Aksaray, Turkey

Received: 03.06.2019

Accepted: 17.01.2020

ABSTRACT

Turtles are important carriers of *Salmonella* agents worldwide. In this study, fecal swab samples were taken from 43 adult turtles from a turtle farm in the west of Turkey. These examples were investigated for *Salmonella* spp. with bacteriological methods. *Salmonella enterica* serotype Newport (SN) were isolated from 6 out of 43 fecal swab samples (13.95%). The isolates were identified with Vitek 2 Compact fully automated identification device and with serological tests. SN causes significant food poisoning in humans through vegetables such as lettuce and cucumber. These data show that turtles can play a porter role in *Salmonella* infections in our country and can infect people through vegetables that grow in the soil. Although studies around the world show that SN infects people with vegetables, there is little data on the role of turtle porters in infection. This study also makes a contribution as it provides more data on a relatively overlooked subject. More detailed studies should be carried out to reveal the relationship between vegetables grown in the soil, turtles and Salmonellosis in Turkey. SN is also important with its rapidly developing antibiotic resistance.

Keywords: *Salmonella enterica* serotype Newport (SN), *Testudo graeca iberica*, Turtle

ÖZ

Türkiye’de Kültüre Edilen Kara Kaplumbağalarından (*Testudo Graeca Ibera*) İlk *Salmonella enterica* Serotype Newport (Sn) İzolasyonu

Kaplumbağalar dünyada *Salmonella* etkenlerinin önemli taşıyıcılarıdır. Bu çalışmada, Türkiye’nin batısındaki bir kaplumbağa çiftliğindeki 43 yetişkin kaplumbağadan fekal sıvab örneği alındı. Bu örnekler *Salmonella* spp. yönünden bakteriyolojik yöntemlerle muayene edildi. Kırk üç fekal sıvab örneğinin 6’sından (%13.95) *Salmonella enterica* serotype Newport (SN) izole edildi. İzolatlar Vitek 2 Compact tam otomatik identifikasyon cihazı ve serolojik testlerle tanımlandı. SN, marul ve salatalık gibi sebzeler vasıtasıyla insanlarda önemli gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. Bu veriler ülkemizde *Salmonella* enfeksiyonlarında kaplumbağaların portör rolü oynayabileceğini ve toprakta yetişen sebzeler aracılığıyla insanları enfekte edebileceğini göstermektedir. Ayrıca dünyadaki çalışmalar SN’nin sebzelerle insanlara bulaştığını gösterse de bulaşmada kaplumbağa portörlüğü hakkında az sayıda veri vardır. Bununla birlikte bu ülkemizde toprakta yetişen bitkiler, kaplumbağalar ve salmonellosis arasındaki ilişkiyi açığa çıkarabilmek için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. SN aynı zamanda çok hızlı gelişen antibiyotik dirençliliği yönüyle de önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella enterica* serotype Newport (SN), *Testudo graeca iberica*, Kaplumbağa

INTRODUCTION

Salmonella is a Gram-negative, facultative intra-cellular bacterium which may penetrate ocular, nasal, oral or intestinal mucous membranes. Salmonellosis is an important problem in global public health. In the United States, Salmonellosis causes 1.4 million gastroenteritis cases (Mead et al. 1999) annually and several billion dollars of economic loss (Voetsch et al. 2004). 35% of these *Salmonella* cases result with hospitalization and 25% with death while 40% respond quickly to treatment (Scallan et al. 2011). According to CDC (2006), *S. newport* ranked in

the top three *Salmonella* serotypes associated with foodborne outbreaks in the United States. In U.S.A, childhood *Salmonella* cases were reported to be caused by turtles and turtle rearing was banned till the establishment of *Salmonella*-free turtle farms. Turtles are also kept as pets in gardens and homes because they are believed to bring good luck in Europe. Although there are no such beliefs in our country, turtles live widely in nature and contaminate food products grown on the ground with their fecal matter. Kristina (2014) and Angelo et al. (2014) have previously explained that SN with PFGE pattern JJPX01.0061 (outbreak strain) is the most pathogenic

strain of SN. This agent is also reported to be a source of contamination for vegetables grown in soil such as cucumbers. A total of 275 SN intoxications were reported in 29 districts in Columbia. Bayer et al. (2011) reported a *S. newport* outbreak originating from Brussels sprouts in Germany. In addition there is evidence of the spread of SN through turtles (Hemmes 1958).

There is no report on SN isolation from turtles in Turkey. The aim of this study is to report the first isolation of SN in cultured turtles in Turkey and point out the fact that turtles can contaminate vegetables with SN.

MATERIALS and METHODS

Materials

43 adult turtles randomly selected from a turtle farm in the west of Turkey were used in this study. Fecal swab specimens taken aseptically were transported to the laboratory under cold chain. Main stocks of turtles in this farm were brought from all over Turkey. Farm environment was observed to be identical to natural conditions and the turtles lived in the soil under the trees (Figure 1). The population on the farm varied between 10-50.000 individuals for export periods.



Figure 1. An image of the turtle farm in which the study was carried out (Turtles living in a natural habitat).

Methods

Isolation of *Salmonella* spp.

Swab samples were transferred to 9 ml Buffered Peptone Water (BPW) and incubated aerobically for 16–18 h. at 37°C. Then, 0.1 ml of the incubated BPW was inoculated into Rappaport–Vassiliadis Medium (Rappaport–Vassiliadis Broth (RVS), Lab M, Lancashire, UK), and incubated at 41.5°C for 24 h. 1.0 ml of the incubated RVS was inoculated in Muller-Kauffmann Tetra-Thionate-Novobiocin Broth (MKTT-Lab M, Lancashire, UK), and incubated at 37°C for 24 h. Then plating on Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) and Mac Conkey Agar was carried out and they were aerobically incubated at 37°C for 24 h (ISO 2002).

Identification of *Salmonella* isolates

We used Microscopy, Vitek 2 Compact device and serological methods for identification. Serology was performed using slide agglutination tests with polyvalent somatic and flagellar antisera (SIFIN, Berlin, Germany) according to Kauffmann-White serotyping scheme (Popoff 2001). Isolates' antibiotic susceptibility patterns were investigated with the disc diffusion method (Koneman

1997) and zones were evaluated according to reference values (CLSI 2000).

RESULTS

In this study, 6 SN were isolated from fecal swab samples of 43 adult turtles. *Salmonella* isolates were found to be susceptible to ceftiofur (30 µg) and gentamycin (10 µg), and resistant to florfenicol (30 µg), penicillin G (10 µg), streptomycin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg), amoxicillin (25 µg) and enrofloxacin (5 µg) (Oxoid).

DISCUSSION

Kristina (2014) and Angelo et al. (2014) stated in their study that people diagnosed with SN were infected with vegetables which caused the food poisoning epidemic. However, researchers have not touched on the topic of contamination of vegetables with SN, which could be caused by turtles. On the other hand, our findings direct our attention to turtle portership. Turtles are important carriers of *Salmonella*. They have a fondness for raw vegetables such as lettuce and cucumbers. They move with their cloacae in close contact with the ground. Therefore, they are prone to be carriers of pathogens leading to food poisoning. Although turtles' natural habitat includes Turkey's agricultural land, similar food poisonings are too sporadic to constitute a significant threat to public health. However, a proper ecological risk/benefit assessment should be taken into account if they are to be included in disease monitoring/combat programs. SN isolates resistant to at least nine antimicrobials (including extended-spectrum cephalosporins), especially, known as serotype Newport MDR-AmpC isolates, have been rapidly emerging as pathogens in both animals and humans throughout the United States (Zhao et al. 2003).

Antibiotic resistant foodborne pathogens can be associated with an increased risk of hospitalization for infected people. Furthermore, a large proportion of resistance mechanisms are encoded on genetic mobile elements, which can be transmitted horizontally to other bacteria potentially present in the intestinal tract (CDC 2006). The fact that *Salmonella* bacteria isolated in the study is resistant to ceftiofur and other antibiotics but susceptible to gentamycin supports this data. On the other hand, turtle diseases are among the least studied diseases in our country. Therefore, this study includes original data. This study may also help new business ideas flourish in our country because there is only one turtle farm in Turkey and the export aspect is strong.

CONCLUSION

SN were isolated from 6 out of 43 fecal swab samples (13.95%) of adult turtles in a turtle farm in Turkey for the first time. It is also evident that the turtles in our country can infect humans with SN through raw vegetables. In addition, further studies are necessary to reveal the relationship between vegetables grown in the soil, turtles and Salmonellosis in Turkey.

REFERENCES

- Angelo KM, Chu A, Anand M et al. (2015). Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- Bayer C, Bernard H, Prager R et al. (2014). An outbreak of *Salmonella* Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, *Euro Surveill*, 9,19-21.

- CDC (2006).** Salmonella Surveillance: Annual Summary. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2001).** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals.
- Cruickshank JP, Duguid BP, Marmion RH (1975).** Swain Medical microbiology. The practice of medical microbiology. VII (12th ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh and New York.
- Hemmes GD (1958).** Transmission of *Salmonella* newport by turtles. *Ned Tijdschr Geneesk*, 102, 39, 1906.
- International Organization for Standardization (ISO) (2002).** Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella*. International Organization of Standardization, Geneva.
- Kristina M (2014).** Outbreak of *Salmonella* Newport Infections Linked to Cucumbers - United States, Morbidity and Mortality Weekly Report.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al. (1997).** Color Atlas of Diagnostic Microbiology, fifth ed., Lippincott.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V et al. (1999).** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 5 (5), 607-25.
- Popoff MY (2001).** Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars (9th ed.), World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning SE (2012).** Veterinary microbiology and microbial diseases, Blackwell Scientific Publication, Oxford London.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ et al. (2011).** Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17 (1), 7-15.
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ et al. (2004).** Food Net estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. *Clin Infect Dis*, 15, 38.
- Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S et al. (2003).** Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5366-71.



The Effect of Used Immunostimulating Drugs with FMD Vaccine on Immunoglobulins in Sheep

Karzan Mohammed ABDULLAH^{1*} Yıldırım BAŞBUĞAN²

¹ *Pebaz Veterinary, Directory of Garmian Veterinary, Ministry of Agriculture and Water resources, Iraq.*

² *Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Van, Turkey*

Received: 01.04.2019

Accepted: 30.12.2019

ABSTRACT

In this study, the effect of used immunostimulating drugs with FMD vaccine on immunoglobulins was aimed to investigate in sheep. For this purpose 40 healthy sheep were divided into 4 groups. Blood and serum samples were taken from all animals from 0 days before the study. Blood samples were measured immediately, and IgA, IgG, IgM, IgE and Zn values from biochemical parameters were stored for measurement. Group I was applied only FMD vaccine, group II Levamisole with the FMD vaccine, group III Zinc with FMD vaccine and the last group IV AD₃E was applied with FMD vaccine. After 21 days, blood and serum samples from all groups were taken again and hematologic and IgA, IgG, IgM, IgE and Zn values were compared according to the values of day 0. No statistical difference was found between the groups except for PLT in hematological parameters ($p > 0, 05$) when compared to pre-vaccination and post-vaccination. In groups II and III there was a significant increase in PLT levels. Biochemical analysis showed IgA, IgG, IgM and IgE levels to be higher in IgG ($p < 0, 05$) and IgE ($p < 0,001$) in groups II and III when levels compared to before vaccination. There were statistically significant increases in IgM ($p < 0,05$) in group IV.

Keywords: FMD, Immunoglobulin, Immunostimulant Drugs, Sheep

öz

Koyunlarda Şap Aşısı ile Birlikte Kullanılan İmmunstimülan İlaçların İmmunglobulinler Üzerine Etkisi

Koyunlarda şap aşısı ile birlikte kullanılan immünstimülan ilaçların immunglobülinler üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla 40 adet sağlıklı koyun 4 gruba ayrıldı. Çalışma öncesinde tüm hayvanlardan 0. gün kan ve serum örnekleri alındı. Hematolojik parametreler hemen ölçüldü, biyokimyasal parametrelerden IgA, IgG, IgM, IgE ve Zn değerleri ölçülmek üzere serumlar saklandı. I. gruba sadece şap aşısı uygulandı, II. gruba şap aşısı ile birlikte Levamizol, III. gruba şap aşısı ile birlikte Çinko ve son grup olan IV. gruba da şap aşısı ile birlikte AD₃E vitamini uygulandı. 21gün sonra tüm gruplardan kan ve serum örnekleri tekrar alındı ve 0. gün değerlerine göre hem hematolojik hem de IgA, IgG, IgM, IgE ve Zn değerleri kıyaslandı. Hematolojik parametrelerin PLT ve NEU hariç gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark belirlenmedi. 0. ve 21. günlere göre kıyaslamada II. ve III. gruplarda PLT düzeylerinde önemli artış ($p < 0,05$) tespit edilirken IV. grupta NEU düzeyinde istatistiksel olarak azalma görüldü ($p < 0,05$). Biyokimyasal analizlerden IgA, IgG, IgM, IgE değerlerinde, 0. güne göre II. grupta IgG ($p < 0,05$) ve IgE ($p < 0,001$), III. grupta IgM ($p < 0,05$), IgE ($p < 0,001$) ve IV. grupta sadece IgE ($p < 0,001$) düzeylerinde artış belirlendi. Gruplar arası kıyaslamada da II. ve III. grup IgG düzeyleri kontrol grubuna göre artış belirlendi ($p < 0,05$). Sonuç olarak Şap aşısı ile birlikte kullanılan levamizole veya çinko uygulanmasının hayvanlarda özellikle IgG ve IgM üzerine olumlu etkilerinin olduğu, aşı ile birlikte bu ilaçların uygulanmasının tavsiye edilebileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: FMD, İmmunglobülin, İmmunostimülanlar, Koyun, Şap

INTRODUCTION

Foot and mouth disease (FMD) is a severe infectious disease of the animals especially ruminant caused by a small, positive-sense RNA virus in the Genus Aphthovirus, Family Picornaviridae, seven serotypes virus include (SAT1, O, SAT2, A, C, Asia 1 and SAT) characterised by high fever,

vesicles on the tongue, mucosa and feet, sudden death in young (Barnett et al. 2002; Wong et al. 2003; Ko et al. 2012; Horsington et al. 2015).

The disease can distribute by contact with animals infected with disease directly, or via contacted with contaminated animal products like during feeding or during drinking

water from the same pool because virus shed mostly in saliva. In ruminants, virus may persist beyond 28 days in the oropharynx of animals for months to years (Paton et al. 2014). Susceptible flock may be infected due contact with infected animals directly or by indirectly and indirect contact with an infected environment. The disease is very rapid transmission when disease animal or these animals that suspected to infecting are in close area, due to contact with each other or through air droplets (Alexandersen et al. 2003). What is the role of sheep herd and what is the role of sheep in transmission of the disease when disease epidemics occur it is not quite clear. By the way, transmission of the disease due to sheep has been showed to be limited, but may be suspected sheep cause of the transmission of disease (Eble et al. 2015).

The mortality rates are already low but rate of morbidity are high when FMD outbreak occurs, with the decrease in milk yield, meat production and poor skin quality and cause abortion with repeat breeding problem in animals and causes in severe economic losses to the flock industry, especially in FMD-free countries of the world (Ko et al. 2012; Rajasekhar et al. 2013; Jeong et al. 2015). Vaccination is the only practicable method to control FMD in endemic countries, vaccines adjuvant with aluminium hydroxide or oil has been successfully used worldwide. But in countries free of FMD includes North and Central America, Europe, Japan, and Australia, control of the disease is based on the prevention and control of entering of the disease through tight regulation entrance and quarantine. So when disease enters into these areas, emergency vaccination may have to support, and should be controlling the movement of animals and use stamping out until quarantine the disease (Hohlich et al., 2003; Clavijo et al. 2004; Sharma et al. 2012; Bucafusco et al. 2014; Saravanan et al. 2015). Because FMD disease have several serotype and not cross-section between serotype so, vaccination generally does not protect against all serotypes, and even between some strains, thus the choice of correct strain of vaccine should take in the vaccination to protection of the animals (Barnett et al. 2002; Uddowla et al. 2012). In this study we used immunostimulant drugs (levamisole, zinc and AD₃E vitamin) with FMD vaccine to increase the immunity that produced in sheep. These three immunostimulant drugs and immunomodulators such as LMS, zinc and vitamin combinations enhance the humoral and nonspecific cellular defence mechanisms in animals.

In the present study; we aimed to define how the immunostimulant drugs effect on level of immunoglobulins (IgM, IgG, IgA, IgE) in sheep when these immunostimulant drugs used together with FMD vaccine. The most effective drugs were also aimed to determine and compaction will also be made.

MATERIALS and METHODS

Materials

In this study, 40 female sheep (1-3) years were selected from a flock of sheep in the region of Van. All routine clinical examinations were performed on the animals, according to the methods described in clinical examination procedures (Lovatt, 2010). After checking heart rate, respiratory rate, body temperature, mucous membrane and skin, 40 sheep were selected which were healthy and in good conditions. The data collected from selected sheep were kept in the record. Final report of the research project detailed above was approved by Yüzüncü Yıl University Animal Local Research Ethic Committee in the session held on 24.11.2016 (decision number 2016/11).

Methods

After checking all Physical examinations of each individual sheep: temperature, pulse, respiration, mucous membrane colour, all 40 selected sheep were in good condition and health. Then all clinical examinations were collected and the data obtained was recorded.

The 40 selected healthy sheep were divided into 4 groups. Each group consisted of 10 sheep. Blood and serum samples were taken from all animals from 0 days which was kept in tubes for measuring serum levels of immunoglobulin and zinc. All serum and plasma samples in Eppendorf tubes were preserved in freezer (-20 °C).

Food and mouth disease vaccine (AFTOVAC Oil®) obtained from market and approved by Food Agriculture and Livestock (Republic of Turkey), was administered to all 4 groups of sheep in the following ways:

Group I. Only FMD vaccine (AFTOVAC Oil®) (1 ml SC) was used.

Group II. In this group, FMD vaccine (AFTOVAC Oil®) (1 ml SC) and levamisole tablet (5 mg/Kg per oral) (Zelensin, Sanovel®) were used.

Group III. In this group FMD vaccine (AFTOVAC Oil®) (1 ml SC) and zinc tablet (30mg/50 Kg per oral) (ZINCO 30 mg Tab. BERKO®) were applied.

Group IV. In this group, FMD vaccine (AFTOVAC Oil®) (1 ml SC) and vitamin AD₃E (IM) (ADEMİN-CEVA-DİF®) were injected.

After 21 days of applying the vaccines and immunostimulating drugs on all groups for measuring serum levels of immunoglobulin and zinc.

Laboratory examinations

Haematological examinations

Blood samples taken from all groups and preserved in EDTA-containing tubes and then analyzed by Veterinary Haematology (MS₄-S). Blood parameters including total WBC, lymphocyte count (LYM), monocyte count (MONO), neutrophil count (NEUT), eosinophil count (EOS), red blood cell count (RBC), haemoglobin concentration (HGB), haematocrit level (HCT) and platelet count (PLT) were measured on days 0 and 21 of the study.

Measurement of immunoglobulin levels

ELISA kits from COSABIO BIOTECH CO., Ltd. (CUSABIO®, China) and ELISA reader (ELISA reader®- DAS) were used to determine Ig values.

Measurement of zinc levels

Serums were isolated from centrifuged blood samples and were then prepared for other biochemical examinations. Zinc levels were determined in the serum samples by Atomic Absorption Spectrometer (AAS) (Thermo®).

Statistical Analysis

Descriptive statistics for the studied variables (characteristics) were presented as mean, standard deviation. After normality test with Kolmogorov-Smirnov test, One-way ANOVA was used for the comparison of means. And then Duncan multiple comparison test was carried out for determination of different groups' mean. In addition Paired t test was performed to compare before and after vaccination in each group. Statistical significance level was considered as 5% and SPSS (ver: 13) statistical program was used for all statistical computations.

RESULTS**Clinical Findings**

All sheep used for the present study were healthy and had normal respiratory rate, normal heart rate (70–80) bpm, normal temperature (38.3–39.9°C), normal lymph nodes, normal conjunctival colour, normal appetite and ruminal movement.

In this study, 30 independent food businesses were visited. Twenty-seven of these plants were restaurants or cafés which were serving animal originated foods while the other 3 were small businesses serving homemade.

Haematological Findings

Haematological findings in all excremental before and after vaccination in table 1.

Serological Findings

Serum immunoglobulin level in the experimental sheep, before and after vaccination in table 2.

Zinc Measurement

Serum levels of Zn in table 3.

Table 1. Descriptive statistics and comparison results for the haematological characteristics

| Parameters | Day | Group I [Only vac. (n=10)] | Group II [Vac.+LMS. (n=10)] | Group III [Vac. + Zn (n=10)] | Group IV [Vac.+AD ₃ E (n=10)] | p* |
|------------------------------|-----|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|-------|
| WBC (10 ⁹ /L) | 0 | 10.33±0.37 | 9.18±0.87 | 10.21±0.46 | 10.85±0.87 | 0,211 |
| | 21 | 10.40±1.17 | 8.78±0.78 | 9.05±0.47 | 10.06±0.87 | 0,198 |
| p # | P | 0,258 | 0,343 | 0,061 | 0,245 | |
| LYM (10 ⁹ /L) | 0 | 2.46±0.47 | 2.71±0.26 | 3.15±0.41 | 3.25±0.36 | 0,058 |
| | 21 | 3.06±0.49 | 2.96±0.32 | 2.81±0.30 | 2.66±0.48 | 0,210 |
| p # | | 0,226 | 0,555 | 0,555 | 0,065 | |
| MONO (10 ⁹ /L) | 0 | 1.31±0.06 | 1.35±0.16 | 1.41±0.14 | 1.43±0.25 | 0,140 |
| | 21 | 1.13±0.18 | 1.20±0.85 | 1.15±0.03 | 1.45±0.13 | 0,161 |
| p # | | 0,010 | 0,587 | 0,010 | 0,396 | |
| NEUT (10 ⁹ /L) | 0 | 5.90±0.76 | 5.03±0.75 | 5.58±0.48 | 6.10±0.54 | 0,058 |
| | 21 | 6.26±0.53 a | 4.53±0.58 b | 4.88±0.47 b | 5.88±0.98a | 0,001 |
| p # | | 0,633 | 0,036 | 0,010 | 0,746 | |
| EOS (10 ⁹ /L) | 0 | 0.10± 0.00 | 0.08± 0.08 | 0.07± 0.08 | 0.07± 0.08 | 0,373 |
| | 21 | 0.03± 0.06 | 0.08± 0.16 | 0.03± 0.05 | 0.07± 0.05 | 0,005 |
| p # | | 0,010 | 0,368 | 0,010 | 0,914 | |
| RBC (10 ⁹ /L) | 0 | 8.42± 1.75 | 8.39± 1.45 | 8.83± 1.05 | 8.47± 0.91 | 0,176 |
| | 21 | 8.52± 1.53 | 8.84± 1.23 | 8.36± 0.78 | 8.01± 0.46 | 0,081 |
| p # | | 0,615 | 0,091 | 0,032 | 0,751 | |
| HGB (g/dl) | 0 | 9.30± 1.35 | 9.73± 1.10 | 10.13± 1.27 | 9.87± 1.23 | 0,653 |
| | 21 | 9.27± 0.96 | 10.13± 1.17 | 9.43± 1.01 | 9.13± 0.25 | 0,068 |
| p # | | 0,571 | 0,724 | 0,103 | 0,696 | |
| HCT (%) | 0 | 27.90± 4.04 | 29.20± 3.30 | 30.40± 3.81 | 29.60± 3.68 | 0,428 |
| | 21 | 27.80± 2.88 | 30.40± 3.51 | 28.30± 3.03 | 27.40± 0.75 | 0,605 |
| p # | | 0,614 | 0,619 | 0,213 | 0,069 | |
| PLT (10 ⁹ /L) | 0 | 202.33±94.83 b | 282.66±77.47 b | 314.16±41.58 ab | 397.66±70.73 a | 0,010 |
| | 21 | 387.66±82.32 b | 370.83±48.77b | 371.00±40.33b | 520.83±61.94 a | 0,010 |
| p # | | 0,010 | 0,016 | 0,010 | 0,010 | |

Different lower cases at the same row represent statistically significant differences among the groups (p<0.05).p#: p value of Paired t test, p*: p values of ANOVA

Table 2. Serum immunoglobulin level in the experimental sheep, before and after vaccination

| Parameters | Day | Group I [Only vac. (n=10)] | Group II [Vac. + LMS. (n=10)] | Group III [Vac. + Zn (n=10)] | Group IV [Vac.+AD ₃ E (n=10)] | p* |
|-------------|-----|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|-------|
| IgM (µg/mL) | 0 | 52.07±6.57 a | 45.17±6.07 a | 42.08±2.91 b | 35.61±5.75 b | 0,010 |
| | 21 | 56.42±7.13 a | 48.89±4.78 a | 52.09±5.66 a | 35.67±2.37 b | 0,010 |
| p # | | 0,803 | 0,113 | 0,010 | 0,632 | |
| IgG (µg/mL) | 0 | 25.53±1.65 b | 33.97±7.23 b | 42.99±3.70 a | 28.81±0.30 b | 0,010 |
| | 21 | 30.35±5.21 b | 44.28±6.28 a | 49.49±7.48 a | 25.64±2.30 b | 0,010 |
| p # | | 0,068 | 0,548 | 0,010 | 0,302 | |
| IgA (µg/mL) | 0 | 15.47±3.25 b | 34.87±4.78 a | 24.69±5.86 b | 30.61±5.35 a | 0,010 |
| | 21 | 46.36±10.91 a | 35.17±5.81 b | 33.68±9.76 b | 28.38±3.37 b | 0,010 |
| p # | | 0,010 | 0,066 | 0,063 | 0,057 | |
| IgE (ng/mL) | 0 | 506.42±192.01 | 445.22±161.02 | 424.17±253.21 | 554.36±103.41 | 0,473 |
| | 21 | 578.73±298.12 b | 690.79±104.15 a | 732.40±101.12 a | 769.05±268.02 a | 0,041 |
| p # | | 0,201 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | |

Different lower cases at the same row represent statistically significant differences among the groups (p<0.05).p#: p value of Paired t test, p*: p values of ANOVA

Table 3. Serum levels of Zn in experimental sheep, on days 0 and 21

| Parameter | Day | Group I [Only vac. (n=10)] | Group II [Vac. + LMS. (n=10)] | Group III [Vac. + Zn (n=10)] | Group IV [Vac.+AD ₃ E (n=10)] | p* |
|-----------|-----|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|-------|
| Zn (mg/L) | 0 | 0.72±0.17 | 0.57± 0.11 | 0.64± 0.13 | 0.50± 0.11 | 0,071 |
| | 21 | 0.60± 0.12 | 0.70± 0.23 | 0.88± 0.21 | 0.65± 0.17 | 0.059 |
| p # | | 0,084 | 0,348 | 0,254 | 0123 | |

Different lower cases at the same row represent statistically significant differences among the groups (p<0.05).p#: p value of Paired t test, p*: p values of ANOVA

DISCUSSION

Foot and mouth disease is a severe infectious disease of animals. FMDV is a small, positive-sense RNA virus in the Family of Picornaviridae and genus Aphthovirus, characterised by high body temperature, vesicles appear on the tongue, mucosa and feet. When young animals infected it cause sudden death (Barnett et al. 2002; Wong et al. 2003; Ko et al. 2012; Horsington et al. 2015).

Vaccination is the only practicable method to control FMD in endemic countries. Vaccines adjuvant with aluminium hydroxide or oil has been successfully used worldwide in the regions including Europe, Japan, Australia, and North and Central America. Controlling and preventing the FMD is based on the prevention of introducing the virus, through tight importation regulation and quarantine. In case of a disease entry into these areas, emergency vaccination may be used, controlling the movement of animal and stamping out for eradication of the disease are also required (Hohlich et al. 2003; Clavijo et al. 2004; Sharma et al. 2012; Bucafusco et al. 2014; Saravanan et al. 2015).

Transmission of the virus occurs inside or among herds; this is different among sheep herds and cattle herds. Vaccination affects transmission of FMD and clinical disease differ among the animal species.

Before taken blood samples from all sheep, all animals examined for any abnormality in respiratory rate, body temperature, heart rate, lymph nodes and eye mucus membrane. Blood was taken and FMD vaccine and

immunostimulant agents were given to the different groups. After blood sample were taken, haematological examinations were done immediately and serum samples were also prepared and stored at -20 °C for serology. In this study, LMS, Zn and vitamin AD₃E were used with FMD vaccine to see whether they enhance immunity or not and also to made a comparison among these three agents regarding their immunostimulant activity.

After haematological examination of blood in day 0, it was found that all blood parameters were normal according to Jackson and Cockcroft (2002). According to the result in table 1 we found that in group of LMS, WBC decreased after 21 day but was not statistically significant. This result was similar to those of Pekmezci and Cakiroglu (2009), Shah et al. (2011) and Raina and Sachar (2014). In zinc group, the level of WBC decreased but was not statistically significant. This result was similar to those of Ramulu et al. (2015). Level of WBC not changed AD₃E group after 21 day. This result was similar to those of Pekmezci and Cakiroglu (2009).

Lymphocyte level decreased after 21 day but not statistically significant. This result was similar to those of Mohri et al. (2005), Pekmezci and Cakiroglu, (2009) and Raina and Sachar, (2014). Level of NEUT in groups of levamisole and zinc decreased in 21 day but was not statistically significant. In vitamin AD₃E group, the level of NEUT decreased after 21 days and statistically was significant (P<0.05), this result was in agreement to the result of Shah et al. (2011) but different from those of Spears (2000) that supplementation of vitamin and β-carotene did not consistently affect neutrophil activity.

The main function of neutrophils is chemotaxis and phagocytosis with subsequent destruction of the bacteria. Neutrophilia occurs mostly in infectious diseases, particularly acute bacterial infections. No significant changes occurred in eosinophil counts in LMS group. This result was similar to those of Pekmezci and Cakiroglu (2009). EOS however did not change notably in Zn group. This result was similar to those of Raina and Sachar (2014). RBC level non-significantly declined in animals treated with Zn. This result was similar to those of Raina and Sachar (2014). Changes in RBC were still within normal range. HGB in levamisole group increased but statistically not significant. This result was similar to those of Pekmezci and Cakiroglu (2009). Decrease in HGB and HCT might be due to RBC lysis/destruction and greater prevalence of erythroblasts (immature RBCs) in the general circulation in zinc treated animal. Support for the present viewpoint can be derived from the findings by Raina and Sachar (2014). Increased level of PLT in sheep treated with AD₃E was not statistically significant. Increased level of PLT in sheep treated with LMS was statistically significant ($P < 0.05$). This result was different from those of Pekmezci and Cakiroglu (2009). Increased level of PLT was statistically significant ($P < 0.05$) in sheep treated with Zn. This result was different from those of Raina and Sachar (2014). A major component of platelet alpha granules is thrombospondin that plays an important role in blood coagulation. Also, platelet-derived endothelial cell growth factor enhances the growth and chemotaxis of endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo (Eales, 2003). The present study define how the immunostimulants effected the level of Igs in sheep, by measuring the level of Ig types (IgM, IgG, IgA and IgE) in the serum of four groups of experimental sheep and compared between level of Igs before and after using the vaccines and immunostimulant drugs.

Group I only vaccinated against FMD, levels of IgM, IgG, IgA and IgE were increased after 21 days. This explained that vaccine has worked properly and immune response against FMD was enhanced. Levamisole is an imidazothiazole derivative and used commonly as an anthelmintic against a broad range of nematodes in different hosts including ruminant, horses, dogs, chickens and humans. Renoux and Renoux (1971) was first reported the immune stimulatory effect of LMS and used to enhance the protection of a Brucella vaccine.

Based on the investigation of Gopalakannan and Arul (2006) it was evident that LMS (250 mg/kg of diet) certainly promoted the nonspecific immunity of *Cyprinus carpio* in ponds. Thus LMS acts as an immunostimulant that appears to improve the immune status and growth of *C. carpio* in fish farms. It is hoped that this base line information will be of potential use in fish farming. In group II, levels of IgM and IgA increased but were not statistically significant, and level of IgG increased and was statistically significant ($P < 0.05$). IgE increased and was statistically significant ($P < 0.001$). When LMS used with killed viruses can induce IgG production more rapidly and at higher levels, LMS injected with a DNA vaccine against the FMDV stimulated both humoral and cellular immune responses in conjunction with a strong production of IFN- γ , (Stelletta et al. 2004; Kang et al. 2005; Fu et al. 2016). Levamisole and vitamin E administered groups resulted with high concentrations of IgM than control calves on day 22 and again increase level of IgG than that of control calves on day 1, 8, 15 and 22 of the trial (Pekmezci and Cakiroglu, 2009).

The effects of LMS on the immune system is complex, and stimulate T-cell responses by enhancing T-cell activation and proliferation, enhance formation of antibodies to various antigens, promote macrophage and monocyte functions such as phagocytosis and chemotaxis and increased neutrophil locomotion, adherence, and chemotaxis (Ocal et al. 2007; Sadigh-Eteghad et al. 2011). According to Stelletta et al. (2004), Kang et al. (2005), Ocal et al. (2007), Pekmezci and Cakiroglu (2009), Sadigh-Eteghad et al. (2011) and Fu et al. (2016), LMS enhances immune system and increases level of the IgG significantly but increased level of IgE might be due to FMD vaccine since it contains adjuvant.

The immunomodulatory importance of Zn was first described by Brazão et al. (2015) who displayed that Zn may act in cell proliferation, DNA metabolism and repair, oxidative defence and cellular signalling pathways, besides being a protective agent against the apoptosis, furthermore, it has been shown that apoptosis is potentiated in Zn deficiency (Brazão et al. 2015). Animal immunity also affected by the level of Zn, it has immunostimulatory activities and keeps the homeostasis of oxidation/reduction. Among the Zn sources studied, organic Zn sources showed better immune activity compared to ZnSO₄ (Lin et al. 2013). In group III, increased level of IgA and IgG were not statistically significant but the level of IgM was statistically significant ($P < 0.05$) and IgE increased and statistically was significant ($P < 0.001$). These finding resembles Schafer et al. (2015). IgG and IgM are the major Igs which are responsible in the complement activation, opsonisation, neutralization of toxins (Shah et al. 2011). Zn deficiency reduced the concentration of IgE and IgG in rats that infected with gastrointestinal nematodes. Thus, the increase in the levels of these Igs in supplemented animals may be initially a result of better mineral supply of zinc (Schafer et al. 2015). And the results were similar to Brazão et al. (2015) it has been indicated that Zn supplementation causes changes in humoral immunity such as stimulation of B-lymphocytes and increased serum Igs levels like IgA and IgG. Thus, the intracellular killing of parasites are triggered or stimulated by zinc treatment. Development of B cells from immature and pre-mature B cells and production of antibody affected by Zn deficiency. Zn deficiency reduces PMN cells chemotaxis and inversely a super-physiological Zn concentration (500 μ M) generates PMN chemotaxis in vitro. A Zn deficiency decreases phagocytosis but Zn supplementation increases it (Bonaventura et al. 2015). Zn decreases T-cell proliferation and causes a shift in the T helper Th1/Th2-balance towards a Th2 response. Thus, especially T cell-mediated cellular immune responses are usually affected by imbalanced Zn levels (Rosenkranz et al. 2015). Zn is also an important factor responsible for the maintenance of physiological balance between the Th1, Th2 and Th17 lymphocyte subtypes. Zinc deficiency decreases the production of cytokines by Th1 and Th17 cells, but has lower effect on the Th2 response (Młyniec et al. 2015). The increased serum globulin concentrations by Zn supplementation implies better immune response with Zn supplementation. An increase in plasma globulin concentration with Zn supplementation was also observed in lactating Friesian cows (Ramulu et al. 2015). According to Bonaventura et al. (2015), Brazão et al. (2015), Młyniec et al. (2015), Ramulu et al. (2015), Rosenkranz et al. (2015) and Schafer et al. (2015) use of vaccine and Zn promotes immune system and increased level of IgG and IgM. But increase of IgE in the present study might be due to adjuvant in FMD vaccine.

A statistically significant variation was found in level of IgG between LMS and Zn groups in the same line ($P < 0.05$) day 21. Based on this results Zn was more effective than LMS on the IgG level. In group IV, IgM was not changed. Levels of IgG and IgA decreased were not statistically significant. Level of IgE increased was statistically significant ($P < 0.001$). Kızıl and Gul (2008) used vitamin AD₃E with FMD vaccine to a group of cattle. The result was a good protection against FMD. This result might explain the anti-stress property of vitamin AD₃E which has minimized the negative effects of the vaccination Gammaz et al. (2010) studied the effect of vitamin AD₃E on growth performance in fish and found that, besides its positive effect on growth, it has also enhanced defense mechanism against diseases via its role in both innate and adaptive immune responses. Vitamin E functions as an antioxidant that scavenges free radicals and protects against lipid peroxidation. The role of vitamin E as an antioxidant may explain its importance in immune responses (Spears, 2000). Combination between multivitamins AD₃E with Newcastle disease vaccine causes increase in antibody titer against Newcastle disease. This element is important for the development of the immune cell structure and eicosanoid formation (Al-zuhairy and Jameel, 2014). When Newcastle disease virus causes infection in poultry with vitamin A deficiency, the result was a decrease in IgG titres and the risk for secondary infection may increase (West et al. 1991). These results were similar to those of West et al. (1991) but were in contrast to those of Kızıl and Gul (2008). During normal activities of the cells, oxidant molecules produced continuously in the body and vitamin A and vitamin E have been reported to remove these oxidant molecules. High dose of vitamin E has been shown to enhance immune response, neutrophil activity and cellular humoral immunity (Kızıl and Gul, 2008). Zn deficiency in animals may occur as a result of its deficiency in soil and pasture, or may be due to stressful conditions such as vaccinations or diseases causing Zn depletion in the body tissues and fluids. Immunity of animal also affected by the level of Zn in dietary diet, organic Zn sources showed better immune activity compared to ZnSO₄ (Lin et al. 2013).

CONCLUSION

It has been concluded that the application of LMS or Zn with FMD vaccine, has positive effects on sheep Igs especially IgG, IgM and IgE, and that animals respond early to infection after use these drugs with FMD vaccine during vaccination. Thus, it is advised to use LMS and Zn with vaccines to potentiate immune responses.

ACKNOWLEDGEMENT

This research is summarized from the master thesis with the same name, supported by Yüzüncü Yıl University Presidency of Scientific Research Projects (project number: TYL-2016-5460).

REFERENCES

- Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM (2003). The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease, *J Comp Path*, 129, 1–36.
- Al-zuhairy MA, Jameel YJ (2014). Effect of ND Vaccine, Multivitamins AD₃E, and Omega-3 on Performance and Immune Response of Broilers. *Mrvsa*, 3, 1, 42–50.
- Barnett PV, Cox SJ, Aggarwal N, Gerbe H, McCullough KC (2002). Further studies on the early protective responses of pigs following immunisation with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine*, 20, 3197–3208.
- Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P (2015). Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev*, 14, 277–285.
- Brazão V, Filipin MDV, Santello FH, et al. (2015). Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. *Immunobiology*, 220, 626–633.
- Bucafusco D, Giacomo SD, Pega J et al. (2014). Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 32, 6576–6582.
- Clavijo A, Wright P, Kitching P (2004). Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot and mouth disease. *Vet J*, 167, 9–22.
- Eales LJ (2003). *Immunology for Life Scientists*, Second Edition, chapter one. Chichester, England. 1-298.
- Eble P.L, Orsel K, Hemert-Kluitenberg FV, Dekker A (2015). Transmission characteristics and optimal diagnostic samples to detect an FMDV infection in vaccinated and non-vaccinated sheep. *Vet Microbiol*, 177, 69–77.
- Fu Y, Wang T, Xiu L et al. (2016). Levamisole promotes murine bone marrow derived dendritic cell activation and drives Th1 immune response in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol*, 31 57–65.
- Gammaz HA, Fayez MM, Abdel-Naby EA (2010). Effect of sanguinarine and vitamins AD₃E on growth performance in *Cyprinus carpio*. *Suez Canal Vet Med J*, 15, 1, 27-44.
- Gopalakannan A, Arul V (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255, 179–187.
- Hohlich BJ, Wiesmuller KH, Haas B, et al. (2003). Induction of an antigen-specific immune response and partial protection of cattle against challenge infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) after lipopeptide vaccination with FMDV-specific B-cell epitopes. *J Gen Virol*, 84, 3315–3324.
- Horsington J, Zhang Z, Bittner H et al. (2015). Early protection in sheep against intratypic heterologous challenge with serotype O foot-and-mouth disease virus using high-potency emergency vaccine. *Vaccine*, 33, 422–429.
- Jackson PGG, Cockcroft PD (2002). Clinical Examination of Farm Animals, Appendix 2 Laboratory Reference Values: *Haematology*, 301-302
- Jeong K, Lee J, Park S et al. (2015). Synthesis and in-vitro evaluation of 2-amino-4-arylthiazole as inhibitor of 3D polymerase against foot-and-mouth disease (FMD). *Eur J Med Chem*, 102, 387–397.
- Kang Y, Jin H, Zheng G et al. (2005). The adjuvant effect of levamisole on killed viral vaccines. *Vaccine*, 23, 5543–5550.
- Kızıl O, Gul Y (2008). Effects of vitamin AD₃E and C on immune responses of cattle to trivalent foot and mouth disease vaccine. *Revue Med Vet*, 159, 12, 599–602.
- Ko Y, Lee H, Park J et al. (2012). Field application of a recombinant protein-based ELISA during the 2010 outbreak of foot-and-mouth disease type A in South Korea. *J Virol Methods*, 179, 265–268.
- Lin S, Lin X, Yang Y, Li F, Luo L (2013). Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 406–407, 79–84.
- Lovatt FM (2010). Clinical examination of sheep. *Small Ruminant Res*, 92, 72–77.
- Młyniec K, Trojan E, Ślusarczyk J et al. (2015). Immune malfunction in the GPR39 zinc receptor of knockout mice: Its relationship to depressive disorder. *J Neuroimmunol*, 10, 1016, 12, 001.
- Mohri M, Seifi HA, Sani SHZ (2005). Effects of oral administration of levamisole on non-specific immunity, serum proteins and health in normal colostrum-fed neonatal dairy calves. *Comp Clin Path*, 13, 132–136.
- Ocal G, Kokcu A, Cetinkaya M.B, Tosun M, Kefeli M, Kandemir B (2007). Efficacy of levamisole on experimental endometriosis. *Int J Gynecol Obstet*, 99, 38–42.
- Paton DJ, Füssel AE, Vosloo W, Dekker A, Clercq KD (2014). The use of serosurveys following emergency vaccination, to recover the status of "foot and mouth disease free where vaccination is not practised". *Vaccine*, 32, 7050–7056.
- Pekmezci D, Cakiroglu D (2009). Investigation of immunomodulatory effects of levamisole and vitamin E on immunity and some blood parameters in newborn Jersey calves. *Vet Res Commun*, 33, 711–721.
- Raina Sh and Sachar A (2014). Effect of Heavy Metal, Zinc and Carbamate Pesticide, Sevin on Haematological Parameters of Fish, *Labeo Boga. Int J Innov Res Sci Eng Technol*, 3, 2319–8753.
- Rajasekhar R, Hosamani M, Basagoudanavar SH et al. (2013). Rescue of infective virus from a genome-length cDNA clone of the FMDV serotype O (IND-R2/75) vaccine strain and its characterization. *Res Vet Sci*, 95, 291–297.

- Ramulu SP, Nagalakshmi D, Kumar MK (2015).** Effect of zinc supplementation on haematology and serum biochemical constituents in Murrah buffalo calves. *Indian J Anim Res*, 49, 4, 482-486.
- Renoux G, Renoux M (1971).** Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunization des souris contre l'infection per Brucella abortus". *Cr. Acad. Sci. (D) Paris* 272:349-350.
- Rosenkranz E, Maywald M, Hilgers RD et al. (2015).** Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. *J Nutr Biochem*, 10, 1016, 11, 010.
- Sadigh-Eteghad S, Khayat-Nuri H, Abadi N, Ghavami S, Golabi M, Shanebandi D (2011).** Synergetic effects of oral administration of levamisole and Echinacea purpurea on immune response in Wistar rat. *Res Vet Sci*, 91 82-85.
- Saravanan P, Sreenivasa BP, Selvan RPT et al. (2015).** Protective immune response to liposome adjuvanted high potency foot-and-mouth disease vaccine in Indian cattle. *Vaccine*, 33, 670-677.
- Schafer AS, Leal MLR, Molento M.B, et al. (2015).** Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. *Small Rumin Res*, 123, 183-188.
- Shah D, Londheva, Mazumder R, Parikh R (2011).** Can levamisole alone maintain the immunity. *Int J Pharm Pharm Sci*, 0975-1491 3, 2.
- Sharma GK, Mohapatra JK, Pandey LK et al. (2012).** Immunodiagnosis of foot and mouth disease using mutated recombinant 3ABC polyprotein in a competitive ELISA. *J Virol Methods*, 185, 52- 60.
- Spears JW (2000).** Micronutrients and immune function in cattle. *Nutr Soc*, 59, 587-594.
- Stelletta C, Cuteri V, Bonizzi L et al. (2004).** Effect of levamisole administration on bluetongue vaccination in sheep. *Vet Ital*, 40, 4, 635.
- Uddowla S, Pacheco J M, Larson C et al. (2013).** Characterization of a chimeric foot-and-mouth disease virus bearing a bovine rhinitis B virus leader proteinase. *Virology*, 447, 172-180.
- West CE, Rombout JHWM, Zijpp AJV, Sijtsma SR (1991).** Vitamin A and immune function. *Proc NutrSoc*, 50, 251-262.
- Wong HT, Cheng SC-S, Sin FW-Y, Chan EW-C, Sheng Z-T, Xie YA (2003).** DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. *Vaccine*, 20, 2641-2647.



Investigation of Antimicrobial Effects of *Amygdalus Trichamygdalus* (Sweet Almond) and *Amygdalus nana L.* (Bitter Almond) Plants

Uğur ÖZDEK^{ORCID} Hamdullah SEÇKİN^{ORCID} Salih ÇİBUK^{ORCID}

Van Yuzuncu Yil University, Van Health Services Vocational School, Van, Turkey

Received: 27.11.2019

Accepted: 17.01.2020

ABSTRACT

In this study, the antimicrobial effect of bitter almond (*Amygdalus nana L.*) and sweet almond (*Amygdalus trichamygdalus*) extract were investigated. The extracts of the sweet almond which plants collected from Diyarbakır Ergani district and the extracts of the bitter almond which plants collected from Van Tuşba district. The almonds dissolved in deionized water, alcohol, and ether. Fungus, gram positive and gram negative bacteria were used as pathogens in this study. The effects of the extracts on pathogens were determined by using the disk diffusion method. According to the zones that were formed by almond extract against bacteria; The highest inhibitory effect of the extract of *Amygdalus nana L.* (Bitter Almond) showed the highest inhibitory effect on *Enterococcus faecalis* and the extract of *Amygdalus trichamygdalus* (Sweet Almond) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Amygdalus Nana L.*, *Amygdalus Trichamygdalus*, Antimicrobial Effect, Extraction

ÖZ

Amygdalus Trichamygdalus (Tatlı Badem) ve *Amygdalus nana L.* (Acı Badem) Bitkilerinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

Yapılan çalışmada acıbadem (*Amygdalus nana L.*) ve tatlı badem (*Amygdalus trichamygdalus*) ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Diyarbakır Ergani ilçesinden toplanan tatlı badem ve Van Tuşba ilçesinden toplanan acı badem bitkilerinin ekstraktlarının deiyonize su, alkol ve eter içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Çalışmada patojen olarak, maya mantarı, gram pozitif ve gram negatif bazı bakteriler kullanılmıştır. Ekstraktların patojenler üzerine etkileri disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Badem ekstraktlarının bakterilere karşı oluşturduğu zonlar göz önüne alındığında *Amygdalus nana L.* (Acı badem) bitkisinin elde edilen ekstraktın gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin *Enterococcus faecalis*'e karşı olduğu belirlenmiştir. *Amygdalus trichamygdalus* (Tatlı Badem) bitkisinden elde edilen ekstraktın gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Amygdalus Nana L.*, *Amygdalus Trichamygdalus*, Antimikrobiyal Etki, Ekstraksiyon

GİRİŞ

Birçok bitkinin yapısında bulunan fenol bileşikleri, organik asit ve yağların özellikle patojen mikroorganizmalara karşı inhibe edici etki gösterdiği bilim insanları tarafından belirlenmiştir. İnsanların doğal ürünlere yönelmesi sonucunda bitkisel ürünlerin yapısında bulunan antimikrobik etken maddeler gıda endüstrisinde önemli bir noktaya gelmiştir (Şengün ve Öztürk 2018).

Bitkilerde bulunan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan bileşikler genellikle alkaloidler fenolik asitler ve türevleri, kuinonlar, saponinler, flavonoidler, taninler ve çeşitleri, kumarinler ve terpenoidler olarak bilinir (Şengün ve Yücel 2015). Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için kullanılan etken maddelerin yaklaşık %80'inin bitkisel odaklı olduğu düşünülmektedir (Keleş ve

ark. 2001). *Allium schoenoprasum L.* (Sirmo) yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının karaciğer koruyucu (Hepatoprotektif) etkisinin olduğunu bildirilmektedir (Koçak ve ark. 2019). Bitkilerin içerisindeki bileşenlerin farklı etkilerinden dolayı birçok alanda kullanılmaktadır (Meydan 2019).

Kullanılan maddelerin in vitro etkinliğini belirlemek amacıyla mikroorganizmalara karşı denemesi için antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilir. Bu çalışmaların kolay uygulanabilmesi ve düşük maliyet gerektirmesi nedeniyle antibiyotik duyarlılığının saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Canlı 2016). Bilim dünyasında, antimikrobiyal maddelerin elde edilmesinde ilerleme kaydedilmesine karşın, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida albicans* ve

Pseudomonas gibi ilaçlara dirençli mikroorganizmaların varlığı sürmektedir (Mann 2012).

Gıda ve kozmetik endüstrisinde kullanılan lavanta (*Lavandula stoechas*), ada çayı (*Salvia officinalis*), papatya (*Matricaria chamomilla*) ve kekik (*Thymus vulgaris*), bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar ve etken maddelerin, bazı bakteri ve mantarların metabolizmalarını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (İlkimen ve Gülbandılar 2018).

Badem gülgiller familyasında bulunan güzel çiçekli bir ağacın meyvesidir. Badem meyvesi sert ve kabukludur. Ülkemizde birçok bölgede kuruyemiş olarak tüketilmektedir. Badem çok fazla miktarda mineral ve vitamin içerir. Ayrıca pekçok hastalığa iyi geldiğinden çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Acı bademler ve tatlı bademler olmak üzere iki gruba ayrılır. Acı bademler siyanidik asit içerdiği için zehirlidir ve yenilmesi sakıncalıdır. Genellikle badem yağı çıkarmak için kullanılır (Özsu 2003). Bitki ekstraktları ve uçucu yağlar; gıdaların muhafazası, farmasötik, alternatif tıp ve doğal tedavilerde kullanımı dahil olmak üzere pek çok uygulamanın temelini oluşturmaktadır (Dulger ve Gonuz 2004).

Tatlı bademlerde siyanidik asit ya çok az bulunur veya hiç yoktur. Ülkemizde badem neredeyse her yerde tohum olarak ekilebilen veya yetiştirilebilen bir ağaç meyvesidir. Badem yağı hem cilt için hem de kabız çocuklar için kabızlığı giderici olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır. Ayrıca acı bademin kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etkilerinin yanında balgam sökücü, dalak ve ciğerden çıkan damarları açma, cinsel isteği artırma, cilt enfeksiyonunun etkilerini azaltma, bronşlar ve boğaz ağrılarını giderme gibi pekçok faydası olduğu söylenmektedir (Özsu 2003). Bazı bilim insanları birçok tıbbi bitkiyi tanımlamış ve bu bitkilerin içerisindeki etken maddelerin çoğunun etkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Ertürk 2003). Antimikrobiyal ajanların etki mekanizmaları, mikroorganizmaların hedef bölgeleri ve bakterinin hücresel yapısıyla ilişkilidir (Karaman 2011).

Günümüzde kullanılan sentez yoluyla elde edilen ilaçların yan etkilerinin fazla olmasından dolayı ve organizmaların antimikrobiyal sentetik ilaçlara karşı direnç oluşturmaları sebebiyle modern tıbbın hastalık tedavisinde yetersiz olduğu bazı noktaları ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı doğal bitkisel kaynakların ve bu maddeleri taşıyan bitkilerin önemi gün geçtikçe artmaktadır (Nakipoğlu 1992). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, ülkemizde birçok sektörde kullanılmak amacıyla yetiştirilen acı ve tatlı bademin farklı patojen mikroorganizmalar üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada kullanılan tatlı badem (*Amygdalus trichamygdalus*) Diyarbakır Ergani ilçesindeki gri-kahverengi gövdeli, sık dalcıklı ve yaklaşık 6-7 metre uzunluğundaki ağaçlardan alınmıştır. Acı badem (*Amygdalus nana L.*) ise Van Tuşba ilçesindeki çalı formu şeklinde büyüyen parlak kahverengi gövdeli bitkilerden toplanmıştır.

Referans Mikroorganizmaları

Bu çalışmada sırasıyla kullanılan mikroorganizmalar; *Staphylococcus aureus* ATTC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25952, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATTC 90028 olmak

üzere 7 farklı referans suş kullanıldı. Mikroorganizmalar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarından temin edildi.

Badem Eksraklarının Hazırlanması

Ekstratlar, Özdek ve ark. (2018)'nın kullandıkları yöntemde minimal değişiklikler yapılarak hazırlandı. Toplanan meyveler, güneş altında 4-5 gün ince bir şekilde serilip sıkça karıştırıldıktan sonra kuruması sağlandı. Kontrolü yapılan ve nem düzeyi istenilen düzeye gelen bademler muhafazaya alındı. Dış kabuktan ayırma işlemi yapıldıktan sonra iki gün güneşte bekletilerek kuruması sağlandı.

Kurutma işleminden sonra bademlerin kabukları kırılarak içleri çıkarıldı. Bademler serin, kuru, havalı ortamda bir süre depolanarak muhafaza edildi. Daha sonra bir öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Her materyalden 15 g tartılarak 150 ml çözücü (deiyonize su, etanol ve eter) içerisinde 48 saat bekletildi. Elde edilen çözeltiler vakumlu rotary evaporatörden geçirilerek çözücülerin buharlaşması sağlandı.

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Test edilecek mikroorganizmaların Müller Hinton besiyeri içinde aktive edilmiş kültürleri kullanıldı. Disk difüzyon metodu ile ekstraktlar patojen mikroorganizmalar üzerinde denendi (Murray ve ark. 1995). Stoklardan alınan mikroorganizmalar Müller Hinton besiyeri içinde 48 saat 37 °C'de inkübe edildi. 10⁻¹ dilüsyonu yapılan canlı kültürden steril swaplar yardımıyla önceden hazırlanmış olan katı Nutrient Agar besiyeri üzerine ekimleri yapıldı. Bir süre beklenerek agarın bakteri solüsyonunu emmesi sağlandı. Daha sonra ekstrakt emdirilmiş diskler steril pens yardımıyla besiyerinin üzerine düzenli bir şekilde ve hafifçe bastırılarak yerleştirildi.

Pozitif kontrol olarak kullanılan referans suşlara karşı etki gösteren Neomycin antibiyotiği kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan petripler inkübasyon için 37 °C'de 48 saat boyunca bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek antimikrobiyal aktivite tespiti yapıldı.

BULGULAR

Amygdalus nana L. ve *Amygdalus trichamygdalus* bitkilerinin meyvelerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı çalışmada, mikroorganizmalara karşı oluşan inhibisyon zon çapı ölçümleri Tablo 1, 2, 3, 4'te verildi.

Buna göre *Amygdalus nana L.* (Acı badem) bitkisinin elde edilen ekstraktın gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin *Enterococcus faecalis* bakterisine karşı olduğu görüldü. Bunun yanı sıra *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine de etki ettiği gözlemlendi. *Amygdalus trichamygdalus* (Tatlı Badem) bitkisinin elde edilen ekstraktın gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı olduğu görüldü.

Ayrıca *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerine de etki ettiği gözlemlendi. Her iki ekstraktın da *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı inhibitör etkisinin olmadığı görüldü.

Tablo 1. *Amygdalus nana L.* ve *Amygdalus trichamygdalus* ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterileri üzerine etkileri ve inhibisyon zonları.

Table 1. Effects of *Amygdalus nana L.* and *Amygdalus trichamygdalus* extracts on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria and inhibition zones.

| Test Mikroorganizmaları ve İnhibisyon Zonları | | | | | | | | |
|---|------------------------------|--------|------|-------------------------|-----|--------|------|------------------------|
| Ekstrakt | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Escherichia coli</i> | | | | |
| | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) |
| <i>Amygdalus nana L.</i> | Yok | 9 | 7 | 22 | Yok | Yok | Yok | 17 |
| <i>Amygdalus trichamygdalus</i> | 11 | 12 | 10 | 18 | 11 | 11 | 9 | 18 |

Tablo 2. *Amygdalus nana L.* ve *Amygdalus trichamygdalus* ekstraktlarının *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* bakterileri üzerine etkileri ve inhibisyon zonları.

Table 2. Effects of *Amygdalus nana L.* and *Amygdalus trichamygdalus* extracts on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* bacteria and inhibition zones.

| Test Mikroorganizmaları ve İnhibisyon Zonları | | | | | | | | |
|---|------------------------|--------|------|--------------------------|-----|--------|------|------------------------|
| Ekstrakt | <i>Bacillus cereus</i> | | | <i>Bacillus subtilis</i> | | | | |
| | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) |
| <i>Amygdalus nana L.</i> | Yok | Yok | Yok | 24 | Yok | 8 | 9 | 32 |
| <i>Amygdalus trichamygdalus</i> | Yok | Yok | Yok | 24 | 7 | 11 | 8 | 24 |

Tablo 3. *Amygdalus nana L.* ve *Amygdalus trichamygdalus* ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* bakterileri üzerine etkileri ve inhibisyon zonları.

Table 3. Effects of *Amygdalus nana L.* and *Amygdalus trichamygdalus* extracts on *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* bacteria and inhibition zones.

| Test Mikroorganizmaları ve İnhibisyon Zonları | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|--------|------|------------------------------|-----|--------|------|------------------------|
| Ekstrakt | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | <i>Enterococcus faecalis</i> | | | | |
| | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) |
| <i>Amygdalus nana L.</i> | Yok | Yok | Yok | 10 | 8 | 12 | 11 | 13 |
| <i>Amygdalus trichamygdalus</i> | Yok | 7 | 8 | 8 | Yok | 9 | 8 | 15 |

Tablo 4. *Amygdalus nana L.* ve *Amygdalus trichamygdalus* ekstraktlarının *Candida albicans* bakterisi üzerine etkileri ve inhibisyon zonları.

Table 4. Effects of *Amygdalus nana L.* and *Amygdalus trichamygdalus* extracts on *Candida albicans* bacteria and inhibition zones.

| Test Mikroorganizmaları ve İnhibisyon Zonları | | | | |
|---|-------------------------|--------|------|------------------------|
| Ekstrakt | <i>Candida albicans</i> | | | |
| | Su | Etanol | Eter | Neomycin (Antibiyotik) |
| <i>Amygdalus nana L.</i> | yok | yok | yok | 7 |
| <i>Amygdalus trichamygdalus</i> | yok | yok | yok | 6 |

TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanların doğal ve sağlıklı gıdalara yönelmesi ile birlikte tıbbi ve aromatik bitkilerin değeri ve önemi her geçen gün daha çok artmaktadır. Bitkilerle yapılan çalışmalar önemli hale gelmiştir. Bitkilerden elde edilen etken maddelerden doğal ilaç üretimi sağlanabilmesinden dolayı bitkilere olan ilgi gün geçtikçe daha da artmaktadır (Baytop 1984). Son yıllarda antibiyotiklere direnç sağlayan bakterilerin ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmemeyen ya da çok az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda çok olması, bilim insanlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya yöneltmiştir (Dürger ve ark. 1999). Bitkilerden elde edilen etken maddelerin patojen mikroorganizmalara karşı göstermiş olduğu etkinin belirlenmesi, gittikçe artış gösteren antibiyotik direncinin önlenmesi noktasında çözüm olacaktır (Singh ve ark. 2011). Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı çok eski tarihlere dayanır. Geleneksel ilaç olarak kullanılan pek çok bitki bulunmaktadır (Parseh ve ark. 2012). Mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanmaları ve yeni patojen mikroorganizmaların ortaya çıkmasından dolayı günümüzde bilim insanları, tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal özelliklerini araştırmaya yönelmişlerdir (Naz ve ark. 2007). Öztürk ve Hamzaçebi (2019) yaptığı çalışmada, *Uva lactuca* ekstraktlarının bazı gram pozitif bakterilere karşı yüksek etki gösterdiğini ve çözücü olarak etanol'ün kullanıldığı ekstraktın çok etkili olduğunu ve sonuç olarak *Uva lactuca*'dan elde edilen ekstraktın gıda ve ilaç sektöründe koruyucu madde potansiyelinin olduğunu tespit etmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının patojenlere karşı oluşturduğu zonlar göz önüne alındığında özellikle farmasötik alanlarda kullanılabilir etken madde içerme potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Sinop ilinde dört bitki ile hazırlanan (*Jurinea kilae*, *Isatis arenaria*, *Verbascum degenii* ve *Pancreatum maritimum*) metanol ve etil alkol ekstraktlarının, bazı hastalardan izole edilen enfeksiyon sebebi mikroorganizmalar üzerine çok önemli antimikrobiyal faaliyet gösterdikleri tespit edilmiştir (Avşar ve ark. 2016). Tunç ve ark. (2013) *Punica granatum L.* (Nar) bitkisinin meyve kabuklarından elde ettikleri ekstraktları antibakteriyel olarak çalışmıştır. Çalışma sonucunda bitki ekstraktlarının en geniş inhibisyon zon çaplarını *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermis* bakterilerine karşı gösterdiğini tespit etmişlerdir. *Pterigynandrum filiforme* karayosunundan elde edilen ekstraktın bazı bakteri ve maya türüne karşı yapılan antimikrobiyal inceleme sonucunda gram pozitif ve gram negatif olan bazı bakteri türlerine etki ettiği bildirilmiştir (Yetgin ve ark. 2017). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında maya mantarına karşı antifungal etkinin olmadığı, buna karşın gram pozitif ve gram negatif bazı bakterilere karşı antibakteriyel etkinin görüldüğü belirlendi.

Zonguldak'ta bazı aktarlardan alınan Portakal, Limon, Kavun, Nar Çekirdeği Yağı ve Ahududu bitkilerinden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve mikroorganizmalara karşı etkisinin olduğu belirlenmiştir (Koçer ve Sugeçti 2015). Eliuz (2018) yaptığı çalışmada zeytinyağı ve mahlep yağı içeriklerini *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* mikroorganizmalarını üzerine etkilerini inceleyerek etnobotanik açıdan önemli sonuçlar elde etmiştir.

Çalışmamızda *Amygdalus nana L.* bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktın idrar, kan, yaralar ve balgam olmak üzere bir çok yerde bulunan patojen *Enterococcus faecalis*

(Dinç ve ark. 2009) bakterisine karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği gözlemlendi. *Amygdalus trichamygdalus* meyvelerinden elde edilen ekstraktın ise *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği gözlemlendi.

Doğada birçok bitki, bakteri ve mantarın mikrobiyal ajanlara karşı etki gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada badem meyvesi ekstraktlarının bazı patojen bakterilere karşı etkileri invitro olarak çalışıldı. Önemli bulgular elde ettiğimiz bu çalışmamızda bitki ekstraktlarının içerik analizleri sonucunda antimikrobiyal etkiyi meydana getiren faktörlerin tespit edilmesi ile başta sağlık sektörü olmak üzere birçok alanda bilim dünyasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Avşar C, Keskin H, Berber İ (2016). Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Mikroorganizmalara Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. *Int J Pure Appl Sc*, 2(1), 22-29.
- Baytop T (1984). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniv. Yay. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, No. 40, İstanbul, 240-376.
- Canlı K, Yetgin A, Akata I, Altuner EM (2016). In vitro Antimicrobial Activity of *Angelica sylvestris* Roots. *Int J Biol Sci*, 1(1), 1-7.
- Dinç BM, Arca EA, Yağcı S, Karabiber N (2009). In-vitro Antibiotic Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Various Clinical Samples. *Turk Hij Den Biyol Dergisi*, 66(3), 117-121.
- Dulger B, Gonuz A (2004). Antimicrobial Activity of Certain Plants used in Turkish Traditional Medicine. *Asian J Plant Sci*, 3 (1), 104-107.
- Dürger B, Ceyhan M, Alıtsaus M, Uğurlu E (1999). *Artemisia absinthium L.* (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *J Of Biology*, 23, 377-384.
- Eliuz EAE (2018). Zeytin Yağı Mahlab Yağı Kombinasyonlarının *E. coli* ve *B. subtilis*'e Karşı Değerlendirilmesi 3. International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC) October 24-26, Adana/Turkey.
- Ertürk Ö, Demirbağ Z (2003). *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji*, 12(47), 27-31.
- İlkimen H, Gülbandır A (2018). Lavanta, Ada Çayı, Kekik ve Papatya Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(4), 241-246.
- Karaman P (2011). Bazı aromatik bitki türlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi.
- Keleş O, Ak S, Bakırel T, Alpınar K (2001). Türkiye'de yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 559-565.
- Koçak Y, Oto G, Yücel UM, Yaşar S, Arıhan O (2019). Karbon tetraklorür ile oluşturulan doku hasarında *Allium schoenoprasum L.* uygulamasının karaciğer ve böbrek dokusunda total antioksidan ve total oksidan düzeylerine etkisi. *Van Sag Bil Derg*, 12(3), 1-10.
- Koçer F, Sugeçti S (2015). Ticari Öneme Sahip Doğal Özütlerin Klinik Patojen Mikroorganizmalara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesi. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 6 (Özel Sayı 2), 28-34.
- Mann A (2012). Evaluation of antimicrobial activity of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennioides* against infectious diseases prevalent in hospital environments in Nigeria. *J Microbiol Res*, 2(1), 6-10.
- Meydan İ (2019). Badem (*Amygdalus Trichamygdalus*) Meyvesinin Etanol Ekstraktı ve Yağının Gs-Ms ile Karakterizasyonu. *Inf Tech and Ap Sci*, 14 (2), 241-250.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (1995). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington: ASM.
- Nakipoğlu M, Otan H (1992). Tıbbi Bitkilerin Flavonitleri. *Anadolu J of AARI*, 4(1), 70-93.
- Naz S, Ahmad S, Rasool SA, Siddiqi R, Sayeed SA (2007). In vitro Antibacterial Activity of the Extracts Derived from *Terminalia catappa*. *Res J Microbiol*, 2 (2), 180-184.
- Özdek U, Başbuğan Y, Yıldırım S, Boğa M, Fırat M, Değer Y (2018). Activity, acute and sub-acute toxicity and safety assesment of the hydroalcoholic root extract of *Diplotaenia turcica*. *Indian J Anim Res*, 52(12), 1688-1694.
- Özsu B (2003). Badem sektörü. <https://www.yumpu.com/tr/document/read/23585247/badem-etudu-raporu-2003-ito>.

- Öztürk F, Hamzaçebi S (2019).** Farklı Çözgenlerle Elde Edilmiş *Ulva lactuca* Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitesi. *Act Aqua Tr*, 15(3), 272-279.
- Parseh H, Hassanpour S, Emam-Djome Z, Lavasani AS (2012).** Antimicrobial Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) as a Tannin Rich Fruit: a Review, The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture, Iran.
- Singh B, Dutt N, Kumar D, Singh S, Mahajan R (2011).** Taxonomy, ethnobotany and antimicrobial activity of *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta* and *Phyllanthus fraternus*. *J Adv Develop Res*, 2(1), 21-9.
- Şengün İY, Öztürk B (2018).** Anadolu Üniv. *Bil.Tek. Der. C – Yaşam Bil. ve Biyotek*, 7 (2).
- Şengün İY, Yücel E (2015).** Antimicrobial properties of wild fruits. *Bio Di Con*, 8(1), 69-77.
- Tunç K, Konca T, Hoş A (2013).** *Punica granatum Linn.* (nar) bitkisinin antibakteriyel etkisinin araştırılması, *SAÜ. Fen Bil. Der*, 17(2), 167-172.
- Yetgin A, Şenturan M, Benek A, Efe E, Canlı K (2017).** *Pterigynandrum filiforme Hedw.* Türünün Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Anatolian Bryo*, 3(1), 43-47.



Investigation of the Protective and / or Therapeutic Effects of Lycopene on Diethylnitrosamine-Induced Chronic Hepatotoxicity Using Biochemical, Molecular and Histopathological Data

Emre KAYA^{1*} Seval YILMAZ¹ Ali Osman ÇERİBAŞI² Selda TELO³

¹ Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Elazığ, Turkey

² Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Elazığ, Turkey

³ Firat University, Faculty of Dentistry, Department of Basic Science, Elazığ, Turkey

Received: 12.12.2019

Accepted: 27.01.2020

ABSTRACT

The aim of the study is to investigate the role of lycopene on diethylnitrosamine (DEN)-induced chronic hepatotoxicity using biochemical, molecular and histopathological approaches. Thirty five male Wistar albino rats were assigned into five groups of 7 rats each. Groups were formed as control, lycopene, DEN, lycopene+DEN and DEN+lycopene. Lycopene was applied to rats every other day at 10 mg/kg/bw, gavage for 10 days. DEN was applied intraperitoneally to rats at a single dose, 200 mg/kg/bw for 90 days. Lycopene administration was started 10 days before the DEN administration in lycopene+DEN group, together with the DEN administration in DEN+lycopene group. The study was terminated 90 days after DEN administration. DEN caused the oxidative stress by the increased malondialdehyde level and the decreased reduced glutathione level, antioxidant enzyme activities ($p<0.001$). Lycopene administration improved the biochemical indices of both blood and liver tissue compared to the DEN group. RT-PCR analysis revealed that the catalase enzyme in the DEN group increased expression levels. Histopathologically, many histopathologic changes such as karyomegaly, necrosis and hydropic degeneration were observed in the liver tissues of the DEN and lycopene+DEN groups. Both biochemical and histopathological results showed that healing of DEN+lycopene group was better than lycopene+DEN group. These results suggest that besides the protective effects, the therapeutic effect of lycopene is due to its antioxidant effects on DEN-induced hepatotoxicity.

Keywords: Antioxidant, Diethylnitrosamine, Lycopene, Malondialdehyde, CAT Enzyme Expression

ÖZ

Biyokimyasal, Moleküler ve Histopatolojik Veriler Kullanılarak Likopenin Dietilnitrozamine Bağlı Kronik Hepatotoksisite Üzerine Koruyucu ve / veya Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması

Çalışmanın amacı, likopenin dietilnitrozamin (DEN) kaynaklı kronik hepatotoksisite üzerindeki rolünü biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik yaklaşımları kullanarak araştırmaktır. 35 adet erkek Wistar albino rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Gruplar, kontrol, likopen, DEN, likopen+DEN ve DEN+likopen şeklinde oluşturulmuştur. Likopen, gün aşırı olarak 10 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda gavaj yoluyla 10 gün uygulanmıştır. DEN, ratlara 200 mg/kg vücut ağırlığı dozunda intraperitoneal olarak tek doz 90 gün uygulanmıştır. Likopen uygulaması, likopen+DEN grubunda DEN uygulamasından 10 gün önce, DEN+likopen grubunda ise DEN uygulaması ile birlikte başlamıştır. DEN uygulamasından 90 gün süre sonra çalışma sonlandırılmıştır. DEN, dokularda malondialdehid düzeylerinde artışa, redükte glutatyon düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinde düşüşe sebep olarak oksidatif strese neden olmuştur ($p<0,001$). Likopen uygulaması hem kan hem de karaciğer dokusunda DEN grubuna kıyasla biyokimyasal endekslerde iyileşme sağlamıştır. RT-PCR analizlerinde DEN grubundaki katalaz enziminin ekspresyon düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir. Histopatolojik olarak, DEN ve likopen+DEN gruplarının karaciğer dokularında karyomegali, nekroz ve hidropik dejenerasyon gibi birçok histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. Hem biyokimyasal hem de histopatolojik sonuçlarda DEN+likopen grubundaki iyileşmesinin likopen+DEN grubundan daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, likopenin koruyucu etkisinden ziyade tedavi edici etkisinin DEN'e bağlı hepatotoksisitede likopenin antioksidan etkisine bağlı kaynaklandığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Dietilnitrozamin, Likopen, Malondialdehid, KAT Enzim Ekspresyonu

INTRODUCTION

Nitrosamines and nitroso compounds are one of the most important chemicals and adversely affect human health and can cause tumor formation. They exhibit this activity mainly by interacting with nucleic acids and proteins (Jahan et al. 2007). The dose, frequency of exposure, and method of administration of the nitrosamines may affect different organs (e.g. lung, kidney or liver) and may lead to tumor formation (Lijinsky and Kovatch 1989; Lijinsky 1992). Toxic effects of nitrosamines, particularly diethylnitrosamine (DEN), are primarily seen in the blood and liver. Most drugs lead to nitrosamine formation and increase of cancerous cells in the liver when used with sodium nitrite. Furthermore, other organs where blood flow is high, such as kidneys, are also affected at a lower dose than the liver (Yilmaz et al. 2008).

DEN is a carcinogenic substance, widely used in experimental animal models. DEN causes degenerative, proliferative, and neoplastic lesions in the liver (Gayathri et al. 2009). DEN is hydroxylated in the liver by cytochrome P-450 isoenzymes and becomes bioactivated by alkylation mechanism. Activation results in the production of radical metabolites, mainly ethyl radical ($\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$) (Lijinsky 1992). DEN increases reactive oxygen species (ROS), and by this way leads to cell damage and oxidative stress. The generation of ROS may be responsible for the carcinogenic effects of DEN (Yamada et al. 2006; Gayathri et al. 2009). High intracellular levels of ROS lead to mitochondrial damage, DNA modification, and lipid peroxidation (LPO), resulting in many diseases, including cancer (Yamada et al. 2006; Pradeep et al. 2007). The metabolites of DEN mediate the binding of tumor promoters by covalently binding to the DNA with one or two oxidation-providing electrons. The tumor promoter causes the formation of reactive oxygen molecules and hydrogen peroxide (H_2O_2) by acting as a superoxide radical ($\text{O}_2\cdot^-$) inducer (Yamada et al. 2006; Pradeep et al. 2007).

Lycopene have anticarcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant effects. The relationship between free oxygen radicals and lycopene is as follows: adding a new radical to the free radical, neutralizing the radical by removing a hydrogen atom from its structure, and neutralizing the radical by transferring an electron from structure of the free radical (El-Agemey et al. 2004). Lycopene can protect cells against oxidative stress by acting together with various mechanisms (e.g. singlet oxygen scavenger) as an antioxidant. Before being reduced, a molecule of lycopene can bind thousands of singlet oxygen molecules (Krinsky 1988). Its effectiveness in capturing singlet oxygen depends on conjugated double bonds number it mainly contains (Ukai et al. 1994).

The aim of the study was to determine the possible protective and / or therapeutic effects of lycopene on DEN-induced oxidative damage and CAT expression in the blood and liver tissues using biochemical, molecular and histopathological approaches in rats.

MATERIALS and METHODS

Animals and experimental groups

A total of 35 male Wistar-Albino rats (weighing 250–300 g, aged 3 months) were used in this study. Ethics committee approval was obtained from Firat University Local Ethics Committee for Animal Experiments (2014/18). The animals to be used in the study were obtained from the Firat University Experimental Research Center.

The experimental applications were conducted conveniently with the conditions for the care and use of laboratory animals (12 hours light; 12 hours darkness; $24\pm 3^\circ\text{C}$). During the experimental applications, the rats were provided the commercial rat feed (pellet feed) and tap water ad libitum.

The animals were randomly divided into five experimental groups, including seven rats in each. These groups were arranged as follows: control group (not treated), lycopene group (lycopene was administered), DEN group (a single dose of DEN was administered), lycopene+DEN (lycopene was started 10 days before the DEN administration), DEN+lycopene group (DEN and lycopene were administered together).

Lycopene was suspended in corn oil and it was administered to the animals by gavage every other day at the dose of 10 mg/kg body weight for 10 days. DEN was administered the animals a single intraperitoneal (i.p.) dose at the dose of 200 mg/kg body weight dissolved in serum physiological (0.9% NaCl) for 90 days. The doses of DEN (El-Shahat et al. 2012) and lycopene (Kumar ve Kumar 2009) used in this study was selected according to previous studies.

Sample collection

Following the applications, rats were sacrificed and tissue samples were obtained from blood and liver. Blood samples were collected in tubes containing anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) and centrifuged for 10 min at 3000 rpm at $+4^\circ\text{C}$ to separate plasma. Autoanalyser (Advia 1800 Chemistry Analyser, Siemens Healthineers, Germany) was used to determine the aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activities. Before starting the analyses, liver tissues were washed with saline and then diluted 1:10 with distilled water and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 15 min for malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), CAT, glutathione-S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) analysis and at 14000 rpm for 55 min for glutathione peroxidase (GSH-Px) analysis.

For the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses, blood and liver samples were taken into tubes containing RNA stabilization solution and stored at -80°C until the study was performed.

Biochemical analysis

MDA and GSH levels, CAT, GSH-Px, GST, SOD activities, protein, hemoglobin levels were determined by spectrophotometric methods in tissue samples.

The MDA level was tested according to the method described by Placer et al. (1966). This method was based on the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with MDA, one of the aldehyde products of lipid peroxidation. The GSH level was determined by the method of Ellman et al. (1961). This method was a spectrophotometric method based on the formation of highly stable yellow colour of sulphhydryl groups when 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) was added.

The CAT activity was carried out by using Aebi's method (1984). It was determined by measuring the resolution of H_2O_2 at 240 nm. The GSH-Px activity was determined by the Beutler method (1984). GSH-Px catalyses the oxidation of GSH to oxidized glutathione (GSSG) using H_2O_2 .

The method described by Habig et al. (1974) was utilised to test GST activity. The enzyme activity was determined by measuring the amount of enzyme catalysing 1 μmol of 1-(S-glutathionyl)-2,4 dinitrobenzene per minute at 340 nm at 37°C using GSH and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. The SOD activity was tested by quantifying O_2^- generated by xanthine and xanthine oxidases reacting with nitroblue tetrazolium (Sun et al. 1988). In the determination of hemoglobin level, Frankel et al. (1970) method is used. The protein concentration was determined using the method described by Lowry et al. (1951).

Total RNA isolation and gene expression analysis

Both blood and liver were processed based on the method of Rotimi et al. (2017). Blood samples were placed into RNAprotect® animal blood tubes containing stabilization reagent; whereas, liver tissues were preserved in RNAlater. The gene expression levels of CAT enzyme was assessed using semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was extracted from the blood using an RNAprotect® animal blood kit (Qiagen, Germany). RNA was extracted from liver using an RNeasy® Plus Mini Kit according to the manufacturer's protocol. cDNA was obtained from RNA samples *via* a Reverse Transcription System Kit (First Strand Kit, Qiagen, Germany) as well as an Applied Biosystem, 7500 Fast RT-PCR System.

The RNA samples were incubated for 15 minutes at 42°C, as well as for 5 minutes at 95°C for cDNA synthesis in accordance with the manufacturer's protocol. The gene specific primers (rat CAT primer (NM_012520)) for RT-PCR were obtained from Qiagen. Reactions were prepared in 25 μl volumes by the SYBR Green Master Mix (Qiagen, Germany). The cycling conditions were performed according to the manufacturer's protocol as follows: 15 minutes at 95°C, 15 seconds at 95°C, and 1 minute at 60°C (repeated for 40 cycles). The RT-PCR analysis results were then normalized against the expression level of the internal control β -Actin (NM_031144). The values of all the samples were expressed as percentages with respect to the control.

Histopathological examination

Following necropsies, liver tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, were embedded in paraffin and cut at a thickness of 5 μm . Then, they were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). After that, 10 random microscopic areas were examined at x40 magnification. The changes were rated to be none (0), mild (1), moderate (2), and severe (3) (Luna, 1968).

Statistical analysis

Shapiro-Wilk normality test was applied to determine whether the raw values of all the measured parameters showed normal distribution and as a result of the test, it was determined that the values in all parameters showed normal distribution. Based on the result of this test, one-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine differences between groups, and *post hoc* Tukey test for paired comparisons.

All statistical analyses were performed using SPSS version 22.0 software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The data obtained as a result of the study are expressed as mean and standard error. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

MDA, GSH levels, and antioxidant enzyme activities

Tables 1 and 2 show the MDA, GSH levels and CAT, GSH-Px, GST and SOD activities in blood and liver tissues. When the DEN treated group was compared with the control group, an increase was observed in the MDA levels and a decrease in GSH levels, CAT, GSH-Px, GST and SOD activities in blood and liver tissue samples ($p < 0.001$). When the DEN group was compared with the group in which lycopene was started before DEN administration (lycopene+DEN group) and group in which lycopene was started together with DEN administration (DEN+lycopene group), MDA levels were found to decrease whereas GSH levels, CAT, GSH-Px, GST and SOD activities were found to increase in the blood tissue and the values of the DEN administered groups approached the values of the control group ($p < 0.001$). Similar changes were observed in the liver tissue and the changes were found to be more significant in the group in which lycopene was given with DEN administration (DEN+lycopene group).

CAT enzyme gene expression levels

Figures 1 and 2 show CAT enzyme gene expression levels in blood and liver tissues. The CAT enzyme gene expression levels were found to be significantly higher in the liver tissues of the DEN treated group compared to those of the control group, however, there was no statistically significant change in blood tissue compared to the control group. A significant decrease was observed in the expression levels in the liver tissue in the lycopene supplemented groups (lycopene+DEN and DEN+lycopene groups) compared to the DEN group and this decrease was found to be higher in DEN+lycopene group.

AST, ALT, ALP and LDH activities

Plasma AST, ALT, ALP, LDH activities are given in Table 3. A statistically significant increase was observed in all values in the DEN group compared to the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.001$). When the lycopene+DEN group and DEN group were compared, no difference was observed in the lycopene+DEN group in terms of AST and ALP activities whereas ALT, LDH activities decreased and approached to the control group values. In the DEN+lycopene group, there was a decrease in AST, ALT, LDH activities compared to the DEN group, but there was no change in ALP activity.

Histopathological results

Microscopic lesions and scoring values of control and experimental groups are given in Table 4. While the severity and distribution varied according to groups, the most significant microscopic changes were generally as follows: cloudy swelling, necrotic changes characterized by karyopyknosis, karyomegaly and apoptosis in hepatocytes and disorganization, sinusoidal and portal congestion, periportal cell infiltration, intra- and extra-cellular bile pigment accumulations, and Kupffer cell hyperplasia on the hepatic cord. The most severe microscopic changes were observed in DEN and lycopene+DEN groups. In the DEN+lycopene group, it was noted that there was a decrease in the severity of degenerative changes in the liver compared to the DEN group.

Table 1. Effects of Lycopene on MDA and GSH levels and CAT, GSH-Px, SOD activities in blood tissue of DEN treated rats.

| | Control | Lycopene | DEN | Lyco.+DEN | DEN+Lyco. |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| MDA (nmol/ml) | 8,34±0,04 ^{ab} | 8,00±0,10 ^a | 11,50±0,17 ^c | 8,57±0,10 ^b | 8,79±0,14 ^b |
| GSH (µmol/ml) | 47,21±0,22 ^a | 47,01±0,40 ^a | 36,03±0,84 ^c | 45,58±0,38 ^a | 45,60±0,38 ^a |
| CAT (k/g Hb) | 65,33±0,78 ^a | 65,22±0,52 ^a | 44,37±0,63 ^d | 62,81±0,99 ^a | 61,84±1,40 ^a |
| GSH-Px (U/g Hb) | 86,07±1,74 ^a | 82,41±2,11 ^a | 60,63±2,74 ^b | 78,55±2,43 ^a | 79,16±0,41 ^a |
| SOD (U/g Hb) | 72,93±0,49 ^a | 72,01±0,44 ^a | 65,84±0,67 ^b | 71,52±0,41 ^a | 72,34±0,33 ^a |

The data are expressed in mean±S.E. for seven animals per group. Within rows, means with different letters (a, b, c, and d) are significantly different.

Table 2. Effects of lycopene on MDA and GSH levels and CAT, GSH-Px, GST, SOD activities in liver tissue of DEN treated rats.

| | Control | Lycopene | DEN | Lyco.+DEN | DEN+Lyco. |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| MDA (nmol/g doku) | 0,63±0,01 ^{abc} | 0,61±0,01 ^a | 0,93±0,02 ^d | 0,68±0,01 ^c | 0,65±0,01 ^{abc} |
| GSH (µmol/ml) | 17,12±0,23 ^a | 17,08±0,10 ^a | 15,10±0,07 ^c | 16,39±0,05 ^b | 16,93±0,05 ^a |
| CAT (k/mg protein) | 0,378±0,01 ^a | 0,381±0,01 ^a | 0,183±0,01 ^c | 0,332±0,02 ^a | 0,335±0,01 ^a |
| GSH-Px (U/g rotein) | 34,19±1,31 ^a | 35,07±0,88 ^a | 28,43±1,11 ^b | 32,61±1,06 ^a | 32,28±1,59 ^a |
| GST (U/mg protein) | 20,92±0,28 ^a | 20,56±0,46 ^a | 17,44±0,26 ^c | 19,37±0,23 ^b | 19,96±0,30 ^{ab} |
| SOD (U/mg protein) | 0,646±0,01 ^a | 0,645±0,01 ^a | 0,629±0,01 ^c | 0,643±0,01 ^a | 0,639±0,01 ^{ab} |

The data are expressed in mean±S.E. for seven animals per group. Within rows, means with different letters (a, b, c, and d) are significantly different.

Table 3. Effects of lycopene on AST, ALT, ALP, LDH activities in plasma of DEN administrated rats.

| | Control | Lycopene | DEN | Lyco.+DEN | DEN+Lyco. |
|------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| AST (U/L) | 171,00±5,77 ^{ab} | 146,33±2,87 ^a | 225,00±5,97 ^d | 242,50±5,71 ^d | 189,66±12,51 ^{bc} |
| ALT(U/L) | 78,25±6,10 ^a | 83,75±2,32 ^{ab} | 96,00±2,22 ^{bc} | 88,71±5,62 ^{ab} | 87,50±6,63 ^{ab} |
| ALP(U/L) | 6,50±0,22 ^a | 7,00±0,28 ^a | 15,00±0,88 ^b | 14,33±2,92 ^b | 13,50±2,46 ^b |
| LDH(U/L) | 794,00±49,07 ^{ab} | 724,57±63,34 ^a | 1363,20±73,63 ^c | 980,66±27,79 ^b | 853,00±28,98 ^{ab} |

The data are expressed in mean±S.E. for seven animals per group. Within rows, means with different letters (a, b, c, and d) are significantly different.

Table 4. Microscopic lesions observed in liver of DEN treated rat.

| | Control | Lycopene | DEN | Lyco.+DEN | DEN+Lyco. |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Karyomegaly | 0.14 ± 0.0 ^a | 0.14 ± 0.0 ^a | 2.00 ± 0.31 ^{bc} | 2.14 ± 0.34 ^c | 1.86 ± 0.14 ^b |
| Sinusoidal Congestion | 0.57± 0.20 ^a | 1.00 ± 0.0 ^b | 2.00 ± 0.0 ^c | 1.71 ± 0.18 ^{bc} | 2.00 ± 0.0 ^c |
| Karyopyknosis | 0.14 ± 0.0 ^a | 0.14 ± 0.0 ^a | 1.57 ± 0.20 ^b | 2.00 ± 0.0 ^c | 1.29 ± 0.18 ^b |
| Cloudy Swelling (Periasiner) | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.44 ± 0.20 ^b | 3.00 ± 0.0 ^c | 3.00 ± 0.0 ^c | 1.71 ± 0.18 ^{bc} |
| Single Cell Necrosis | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.57 ± 0.20 ^a | 2.57 ± 0.20 ^b | 2.71 ± 0.18 ^b | 1.43 ± 0.18 ^{ab} |
| Fatty Degeneration | 0.14 ± 0.14 ^a | 0.0 ± 0.0 ^a | 1.00 ± 0.0 ^{ab} | 1.00 ± 0.0 ^{ab} | 1.00 ± 0.0 ^{ab} |
| Bile Duct Proliferation | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.14 ± 0.0 ^a | 2.00 ± 0.0 ^c | 1.00 ± 0.0 ^b | 1.00 ± 0.0 ^b |
| Apoptotic Bodies | 0.14 ± 0.0 ^a | 0.14 ± 0.0 ^a | 2.00 ± 0.0 ^c | 1.00 ± 0.0 ^b | 1.00 ± 0.0 ^b |
| Kupffer Cell Activation | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.43 ± 0.20 ^{ab} | 1.00 ± 0.0 ^b | 1.00 ± 0.0 ^b |
| Periportal Cell Infiltration | 0.57 ± 0.20 ^a | 0.71 ± 0.18 ^a | 1.43 ± 0.20 ^b | 1.29 ± 0.18 ^b | 1.00 ± 0.0 ^{ab} |
| Hepatic Cord Disorganization | 0.29 ± 0.18 ^a | 0.29 ± 0.18 ^a | 2.57 ± 0.20 ^c | 2.00 ± 0.31 ^{bc} | 2.00 ± 0.21 ^{bc} |
| Portal Congestion | 1.00 ± 0.0 ^a | 1.00 ± 0.0 ^a | 1.29 ± 0.18 ^b | 1.43 ± 0.20 ^b | 1.43 ± 0.20 ^b |
| Bile Pigment Accumulations | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 1.00 ± 0.0 | 1.00 ± 0.0 | 1.00 ± 0.0 |

The data are expressed in mean±S.E. for seven animals per group. Within rows, means with different letters (a, b, and c) are significantly different (p<0.001).

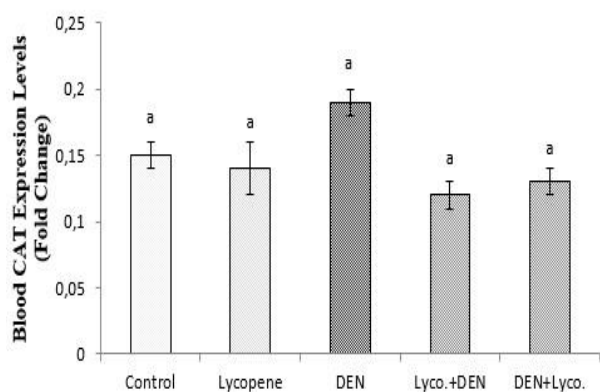


Figure 1. The effect of lycopene supplementation on blood CAT expression level.

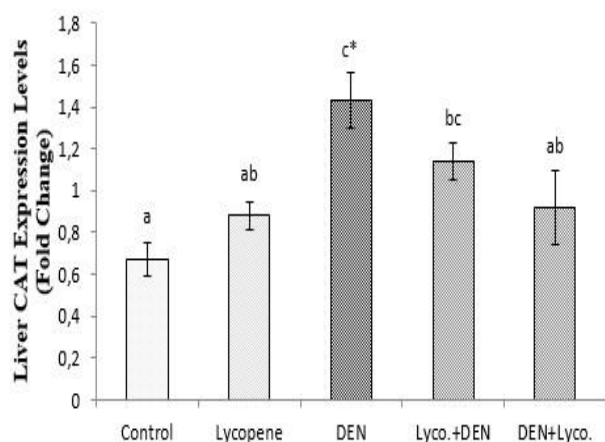


Figure 2. The effect of lycopene supplementation on liver CAT expression level (* $P < 0.001$).

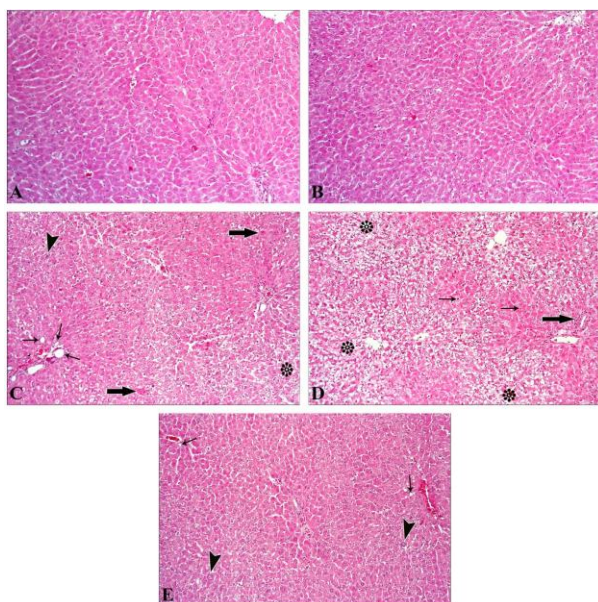


Figure 3. Light microscopic view of the liver of DEN-treated rats. A. Control Group, normal appeared liver structure. B. Lycopene Treated Group, normal appeared liver structure. C. DEN Treated Group, karyomegaly (arrowhead), necrosis-necrotic changes (*), single cell necrosis (thick arrow), bile duct proliferation (thin arrow). D. Lycopene+DEN Treated Group, cloudy

swelling (*), periportal cell infiltration (thick arrow), apoptotic bodies (thin arrow). E. DEN+Lycopene Treated Group, karyomegaly (arrowhead), fatty degeneration (thin arrow). (H-E staining, magnification x40).

DISCUSSION

The free radical formation may be suggested as the main mechanism of hepatotoxicity although many opinions have been reported in the pathogenesis of DEN-induced toxicity. If the generation of free radicals exceeds the protective effects of the defense system, they adversely affect metabolism. The increase in the MDA level is an important sign of oxidative stress (Gaweł et al. 2004). In the present study, the increase in MDA levels in plasma and liver tissues obtained from rats in the DEN group can be considered as an indicator of the DEN-induced damage. This increase may be further related to the metabolism of DEN, which reacts with cellular components, particularly with polyunsaturated fatty acids, in the cell membrane and causes the release of iron ions that increases the MDA levels. GSH prevents the peroxidation, protects cell membranes and allows the removal of free radicals (Farombi and Fakoya 2005). In the present study, the decrease observed in the GSH levels in blood and liver tissues of the rats in the DEN group is attributed to DEN or its metabolites forming a conjugate with GSH to facilitate its excretion from the body. Furthermore, GSH plays a critical role in protecting tissues against the harmful effects of DEN and therefore, GSH consumption can also lead to significant decreases in GSH-Px activity. The decrease in GSH-Px activity following the DEN administration may be due to decreased levels of the relevant substrate (GSH) and ROS-induced changes in the protein structure (Farombi and Fakoya 2005; Halliwell and Gutteridge 2015).

In the present study, MDA levels in plasma and liver tissues were found to be significantly higher in the DEN group than in the control group. This indicates that DEN causes high levels of free radical formation that cannot be tolerated by the cellular antioxidant defense system. However, lycopene administration decreased the MDA level to the level in the control group, suggesting that lycopene may be effective in clearing free radicals, inhibiting LPO, and protecting membrane lipids against oxidative damage in plasma and liver of rats.

Antioxidant enzymes such as CAT and GSH-Px are the first line antioxidant defense system against ROS and their activities have been observed to decrease by DEN. The decrease in the CAT and GSH-Px activities due to the DEN-induced oxidative stress may be due to the possible inhibitory effect of DEN-induced ROS on these enzymes, and decreased availability of GSH as a substrate while GSH-Px catalyzes the conversion of lipid peroxide to hydroxy acids in the presence of GSH (Farombi and Fakoya 2005; Halliwell and Gutteridge 2015). In the study, lycopene supplementation increases blood antioxidant activities and thus prevents the detrimental effects of peroxidation products.

In a study by Kim et al. (1997), in which different nitrosamines (DEN, N-methyl-N-nitrosourea, and 1,2-dimethylhydrazine) were used in mice, the combination of DEN (10 mg/kg i.p.) with other nitrosamines has been reported to increase the neoplasia and oxidative stress in the lungs of mice at the end of 32 weeks. In a study by Pradeep et al. (2007), the effects of silymarin on DEN-induced hepatotoxicity (200 mg/kg i.p.) has been investigated and authors have reported an increase in

some liver-specific enzymes and LPO whereas there is a decrease in the antioxidant enzyme levels in the DEN group. In another study by the same authors investigating the effects of Cassia fistula on DEN-induced hepatotoxicity (100 mg/kg i.p.), they have reported that some liver-specific enzymes and LPO have increased whereas antioxidant enzyme levels have decreased, similar to their previous study (Pradeep et al. 2010).

In a study published in the literature, a significant decrease has been reported in gene expression levels of GST, CAT and GSH-Px enzymes in the DEN group in parallel with the decrease in antioxidant enzyme activities. The decrease in antioxidant enzyme activities and CAT gene expression after DEN administration has been attributed to the increase in the production of free radicals during DEN metabolism (Sayed-Ahmed et al. 2010). In a study by Bingül et al. (2015), a decrease has been reported in the CAT activity and expression levels in DEN treated rats. However, CAT enzyme expression levels were found to increase in groups treated with DEN in our study, contrary to other studies in the literature. The difference between CAT activity and expression level is thought to be due to the procedures performed after the post-translational transformations. There are studies, in which antioxidant compounds were used against oxidants in different tissues in oxidative stress, showing that these oxidant compounds increase (Kim et al. 2009) or decrease (Fustinoni-Reis et al. 2016) the CAT gene expression levels in particular among the antioxidant enzymes. Changes in the present study are thought to be caused by DEN-induced oxidative DNA damage in rat liver. Metabolites formed during the metabolism of DEN via cytochrome P-450 lead to oxidative, mutagenic and genotoxic damages in tissues.

In the present study, CAT enzyme activity in blood and liver tissues decreased significantly but the expression level of the same enzyme increased in DEN treated groups compared to the control group. The difference between CAT activity and gene expression level is thought to be due to variation in protein and mRNA transformation. Furthermore, the relationship between genotype and mRNA/protein levels can be also influenced by various factors such as environment and transcriptional regulation.

There are studies reporting that lycopene significantly changes LPO levels and antioxidant enzyme activities. In a study by Gupta et al. (2013) involving mice, the group received pretreatment with lycopene was compared with the DEN treated group and pretreatment with lycopene has been reported to have no significant effect on the activity of phase I enzymes, to decrease the LPO and GSH levels and to increase GSH-Px, GST and SOD activities. Blanche et al. (2013) have investigated the effects of Apo-10'-lycopenoic acid (10 mg/kg diet), a lycopene metabolite, in mice that were given DEN initially and fed with a high-fat diet for 24 weeks. They have observed a decrease in both the development of hepatic carcinogenesis and incidence of lung tumors. Abdallah et al. (2004) have investigated the protective effects of lycopene in DEN-induced (200 mg/kg body weight) experimental hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma has been reported to develop in rats after six weeks and lycopene has been observed to inhibit the development of hepatocellular carcinoma. In rats that a single dose of DEN was administered intraperitoneally for 30 days, it was determined that lipid peroxidation levels and liver-specific enzyme activities were increased, and antioxidant enzyme activities and CAT enzyme expression levels were changed in compared to the control group. It

was found that lipid peroxidation levels and increased liver-specific enzyme activities decreased and CAT enzyme expression levels approached control values in the group with lycopene application with DEN. It has been emphasized that lycopene exhibited an antioxidant property against DEN-induced LPO and related enzymes in rats (Kaya et al. 2019).

There are studies in the literature showing that pretreatment with lycopene is effective and pretreatment with lycopene has been reported to be effective (Qu et al. 2013). There are also studies showing that lycopene is effective when applied together with toxic substances (Yilmaz et al. 2006). In the present study, lycopene has been found to be more effective in DEN-induced hepatotoxicity in the group where it has been started together with DEN administration.

The increase in some liver-specific enzymes activities have a correlation with the number of cells transformed in the event of cancer (Jahan et al. 2007). Many studies have shown that DEN administration causes an increase in some liver-specific enzyme activities (Liu et al. 2005; Jahan et al. 2007; Shaarawy et al. 2009; Taha et al. 2010). In this study, DEN administration has significantly increased plasma AST, ALT, ALP, LDH activities, which is a sign of hepatocellular injury. This may be due to the rapid release of these enzymes from the cytoplasm into the bloodstream following the breakage of the plasma membrane and cellular damage.

CONCLUSION

Increased LPO levels and liver-specific enzyme activities and decreased enzymatic and non-enzymatic antioxidant levels are the signs of a liver injury. Moreover, elevated levels of CAT expression due to the increased oxidative stress are supportive. Considering the results of our study, it can be concluded that oxidative stress plays an important role in DEN-induced liver injuries. Furthermore, the effect of lycopene given together with DEN administration has been observed to be higher than the effect of lycopene given before DEN administration. Based on the biochemical, molecular and histopathological results of the study, the therapeutic effect of lycopene can be said to be more evident than its protective effect.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank FUBAP (VF.14.19) for financially supporting the study and this article is a part of the first author's doctoral thesis named "The Effect of Lycopene on Oxidative Stress and DNA Damage in Diethylnitrosamine Administered Rats".

REFERENCES

- Abdallah IZ, Khattab HA (2004).** Protective role of lycopene against diethylnitrosamine induced experimental hepatocarcinogenesis. *Egypt J Hosp Med*, 16 (1), 1-13.
- Aebi H (1984).** Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, 105, 121-126.
- Beutler E (1984).** Red Cell Metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Starton (Editors), 2nd Edition, 160, New York.
- Bingül I, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF et al. (2016).** Blueberry treatment attenuated cirrhotic and preneoplastic lesions and oxidative stress in the liver of diethylnitrosamine-treated rats. *Int J Immunopathol Pharm*, 29(3), 426-437.
- Blanche Clp, Hu KQ, Liu C, et al. (2013).** Lycopene Metabolite, Apo-10'-Lycopenoic acid, inhibits diethylnitrosamine-initiated, high fat diet-promoted hepatic inflammation and tumorigenesis in mice. *Cancer Prev Res*, 6 (12), 1304-1316.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, et al. (2004).** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys*, 430 (1), 37-48.
- El-Shahat M, El-Abd S, Alkafay M, El-Khatib G (2012).** Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: Myrrh (*Commiphora molmol*) vs. turmeric (*Curcuma longa*). *Acta Histochem*, 114 (5), 421-428.
- Farombi EO, Fakoya A (2005).** Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res*, 49 (12), 1120-1128.
- Frankel SS, Reitman S, Sonnenwirth AC (1970).** Grandwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. In: Reading CA, Glynn LE (Editors). 7th Edition, 403-404, The C. V. Mosby Company, St Louis, USA.
- Fustinoni-Reis AM, Arruda SF, Dourado LP, Cunha da MS, Siqueira E (2016).** Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) consumption modulates iron homeostasis and prevents iron-induced oxidative stress in the rat liver. *Nutrients*, 8 (2), 38.
- Gaweł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P (2004).** Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*, 57 (9-10), 453-455.
- Gayathri R, Priya DK, Gunassekaran GR, Sakthisekaran D (2009).** Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma induction by diethylnitrosamine in male Wistar rats. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10 (5), 933-938.
- Gupta P, Bansal PM, Koul A (2013).** Lycopene modulates initiation of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis: Studies on chromosomal abnormalities, membrane fluidity and antioxidant defense system. *Chem Biol Interact*, 206 (2), 364-374.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974).** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249 (22), 7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015).** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, USA.
- Jahan MS, Vani G, Shyamaladevi CS (2007).** Effect of *Solanum trilobatum* on hepatic drug metabolising enzymes during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital in rat. *Hepatol Res*, 37 (1), 35-49.
- Kaya E, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Telo S (2019).** Protective effect of lycopene on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and catalase expression in rats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 66(1), 43-52.
- Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, et al. (1997).** Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett*, 120 (1), 15-22.
- Kim S, Choi JE, Choi J, et al. (2009).** Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro*, 23 (6), 1076-1084.
- Krinsky NI (1998).** Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218 (2), 95-97.
- Kumar P, Kumar A (2009).** Effect of lycopene and epigallocatechin-3-gallate against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione depletion in rat: a novel nitric oxide mechanism. *Food Chem Toxicol*, 47 (10), 2522-2530.
- Lijinsky W (1992).** Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Pres.
- Lijinsky W, Kovatch RM (1989).** Carcinogenesis by nitrosamines and azoxyalkanes by different routes of administration to rats. *Biomed Environ Sci*, 2 (2), 154-159.
- Liu LL, Gong LK, Qi XM, et al. (2005).** Altered expression of cytochrome p450 and possible correlation with preneoplastic changes in early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin*, 26 (6), 737-744.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951).** Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-257.
- Luna LG (1968).** Manual of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 1-36, McGraw-Hill Book Co, New York.
- Placer ZA, Cushman L, Johnson BC (1966).** Estimation of products of lipid peroxidation in biological fluids. *Anal Biochem*, 16: 359-364.
- Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S (2007).** Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Euro J Pharmacol*, 560 (2-3), 110-116.
- Pradeep K, Raj Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S (2010).** Protective effect of *Cassia fistula* Linn. on diethylnitrosamine induced hepatocellular damage and oxidative stress in ethanol pretreated rats. *Biol Res*, 43 (1), 113-125.
- Qu M, Nan X, Gao Z, et al. (2013).** Protective effects of lycopene against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule neurons. *Brain Res*, 1540, 92-102.
- Rotimi OA, Rotimi SO, Duru CU, et al. (2017).** Acute aflatoxin B1-Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. *Toxicol Rep*, 4, 408-414.
- Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie S, et al. (2010).** Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 3 (4), 254-261.
- Shaarawy SM, Tohamy AA, Elgendy SM, et al. (2009).** Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci*, 5 (6), 549-557.
- Sun Y, Oberly LW, Ying LA (1988).** Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34 (3), 497-500.
- Taha MM, Abdul AB, Abdullah R, et al. (2010).** Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chem Biol Interact*, 186 (3), 295-305.
- Ukai N, Lu Y, Etoh H, et al. (1994).** Photosensitized oxygenation of lycopene. *Biosci Biotech Biochem*, 58 (9), 1718-1719.
- Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H (2006).** In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med*, 40 (11), 2040-2046.
- Yılmaz S, Karahan İ, Kandemir FM (2008).** Bazı nitrozaminlerin ratlarda doku pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkileri. *F.Ü. Sağ Bil Derg*, 22 (3), 163-168.
- Yılmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S (2006).** Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218 (2), 164-171.



Three-Dimensional Investigation by Computed Tomography of the Clavicle and Scapula in Van Cats

Osman YILMAZ^{1*}  Zafer SOYGÜDER¹  Alpaslan YAVUZ² 

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Van, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Radiology, Van, Turkey

Received: 07.11.2019

Accepted: 26.02.2020

ABSTRACT

This study was carried out to obtain the three-dimensional reconstruction by computed tomography, the anatomical structures, the morphometric and volumetric measurement values of the clavicle and scapula which are the bones forming the forelimb skeleton in adults Van cats, which have an important position among the world's cat breeds and to show the differences between these indicators in both genders. A total of sixteen adult Van cats, 8 male and 8 female, were used in the study. According to morphometric analyses, statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed between measured values of the clavicle and scapula in both gender of Van cats. The volumetric measurement values of the clavicle and scapula were found to be higher in male cats than in female cats. These differences were also determined to be statistically significant ($p < 0.05$). In conclusion, the clavicle and scapula bones were evaluated morphologically, morphometric and volumetric in Van cats. Morphometric and volumetric measurement values of these bones were determined to be statistically different in males and females cats. In addition, it was observed with this study that some anatomical structures would be learned or taught with medical imaging methods by giving support to their vitality and comfort without any physical damage to living beings.

Keywords: Clavicle, Computed tomography, Scapula, Three-dimensional reconstruction, Van cat

ÖZ

Van Kedilerinde Clavicula ve Scapula'nın Bilgisayarlı Tomografi Görüntülerinin Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi

Bu çalışma dünya kedi ırkları arasında önemli bir konuma sahip olan Van kedilerinin ön bacak iskeletini oluşturan kemiklerden olan clavicula ve scapula'nın bilgisayarlı tomografi ile üç boyutlu rekonstrüksiyonunu yapmak, anatomik yapılarını, morfometrik ve volümetrik ölçüm değerlerini elde etmek ve bu değerlerin cinsiyetler arasındaki farklılıklarını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Çalışmada 8 erkek, 8 dişi olmak üzere toplam 16 adet erişkin Van kedisi kullanıldı. Morfometrik analiz sonuçlarına bakıldığında ön bacak kemiklerindeki clavicula ve scapula'nın ölçüm değerlerinde cinsiyetler açısından istatistiksel farklılıklar olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Clavicula ve scapula'ya ait volümetrik ölçüm değerlerinin ise erkek kedilerde dişi kedilere göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu farklılıkların da istatistik olarak önemli düzeyde olduğu görüldü ($p < 0.05$). Sonuç olarak, Van kedilerinin clavicula ve scapula kemikleri morfolojik, morfometrik ve volümetrik olarak değerlendirildi. Morfometrik ve volümetrik ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak erkek ve dişiler arasındaki farklılıkları tespit edildi. Ayrıca bu çalışmayla, bazı anatomik yapıların canlılara herhangi bir bedensel zarar verilmeden, canlılıkları ve konforları dikkate alınarak medikal görüntüleme yöntemleriyle öğretilebileceği veya öğretilebileceği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Bilgisayarlı tomografi, Clavicula, Scapula, Üç boyutlu rekonstrüksiyon, Van kedisi

GİRİŞ

Evcil kediler, günümüzde dünyanın hemen hemen her yerinde yaşayabilmektedir (Randi ve ark. 2001). Son zamanlarda dünya çapında oldukça büyük bir ilgi toplayan evcil kedilerden birisi de, Van Gölü ve çevresinde yaşayan Van kedisi'dir. Van yöresinde yetiştirilen, Doğu Anadolu Bölgesi ve ülkemiz açısından önemli bir değer ve zenginlik

kaynağı olan Van kedileri, eşsiz fiziksel özelliklerinden dolayı tarih boyunca insanların ilgisini ve beğenisini kazanmıştır (Odabaşoğlu ve Ateş 2000). İnsanda iyi gelişmiş fonksiyonel bir kemik olan clavicula (Standing 2008; Liebich ve ark. 2015), evcil memeli hayvanlarda ya yoktur ya da m. brachiocephalicus'un içerisine gömülü halde bulunur. İskelet kemiklerine bağlanmayan küçük, yassı ve hafif kavimsel bir kemiktir (Liebich ve ark. 2015).

Scapula ise, yassı ve üçgen şeklinde bir kemiktir. Gövdeye kaslar aracılığıyla bağlanır (syndesmosis). Articulatio humeri aracılığıyla kendisinden sonra gelen gelen kemik olan humerus'a eklenir (Dursun 2002a). Son yıllarda medikal görüntüleme alanlarındaki teknolojik gelişmeler ve üç boyutlu rekonstrüksiyon programları sayesinde anatomi öğretiminde, hastalıkların teşhisinde ve tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir (Brenton ve ark. 2007; Ozkadif ve ark. 2019). Özellikle kedi, köpek gibi küçük pet hayvanlarında bilgisayarlı tomografi ve üç boyutlu rekonstrüksiyon programları iskelet sistemindeki anatomik yapıların morfolojik, morfometrik, volümetrik ve patolojik olarak değerlendirilmesinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ohlerth ve Scharf 2007; Yılmaz 2018).

Bu çalışmada Yetişkin Van kedilerindeki clavícula ve scapula'larının bilgisayarlı tomografi görüntülerinden üç boyutlu rekonstrüksiyonu yapılarak anatomi eğitimi açısından kullanılmasının sağlanması, morfolojik olarak incelenmesi, morfometrik ve volümetrik ölçüm değerlerinin elde edilmesi, bu ölçüm değerlerinin cinsiyetler arasındaki biyometrik farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır. Bununla birlikte, elde edilecek bulgular vasıtasıyla, Van kedilerinin anatomik özelliklerinin ortaya çıkarılması ile ilgili yapılacak olan bilimsel çalışmalara katkı sağlanması düşünülmektedir.

MATERYAL ve METOT

Deney Hayvanları

Araştırmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Van Kedisi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 4 ile 6 yaşları arasında, 3100- 6000 gr (dişilerde ortalama ağırlık 3600 gr, erkeklerde ortalama ağırlık 4912,5 gr) ağırlığında 8 erkek, 8 dişi olmak üzere toplam 16 adet erişkin Van kedisi kullanıldı. Belirlenen kedilere çalışmadan 24 saat öncesine kadar ad libitum olarak içme suyu ve standart kedi yemi verildi. Sunulan bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.01.2017 ve 2017/01 sayılı kararı ile gerçekleştirildi.

Anestezi

Çalışmaya dahil edilen Van kedileri numaralandırılarak 24 saat öncesinden aç bırakıldı. BT uygulamasına alınan kedilerin anestezisi için Ketamine (15 mg/kg, IM, Ketazol® %10 enjektabl, İnterhas Veteriner İlaçları, Ankara) ile Xylazine (1-2 mg/kg, IM, Alfazyn® %2 enjektabl, Ege - Vet Veteriner İlaçları, İzmir) kombinasyonu kullanıldı.

Bilgisayarlı Tomografi Görüntülerinin Alınması

Kedilerin bilgisayarlı tomografi (BT) tetkikleri için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Ana Bilim Dalı'nda mevcut 16 dedektörlü çok kesitli bilgisayarlı tomografi (BT) cihazı (Somatom Sensation 16; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) kullanıldı. Anestezi altındaki kediler, gantri içerisine serilen "disposable" örtü üzerine "head first" olacak şekilde prone pozisyonunda simetrik bir şekilde yerleştirildi. Çekim sırasında BT cihazı parametreleri; KV / Effective mAs / Rotation time (sec) değerleri 120 / 120 / 0.75; gantri rotation period 420 ms; fiziksel dedektör collimation, 16 × 0.6 mm; kesit kalınlığı, 0,75 mm; final section colimation, 32 × 0.63 mm; feed/rotation, 6 mm; Kernel, U90u; increment 0.5 mm; resolution 512 × 512 pixel olacak şekilde belirlendi. BT uygulama dozlarının parametreleri ve yapılan taramalar, standart protokoller ve literatür esas alınarak gerçekleştirildi (Prokop 2003; Kalra ve ark. 2004). Elde edilen imajlar DICOM formatında işlenmek üzere iş

stasyonuna (Leonardo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) aktarıldı.

Görüntülerin Üç Boyutlu Rekonstrüksiyonu ve Ölçümlerinin Alınması

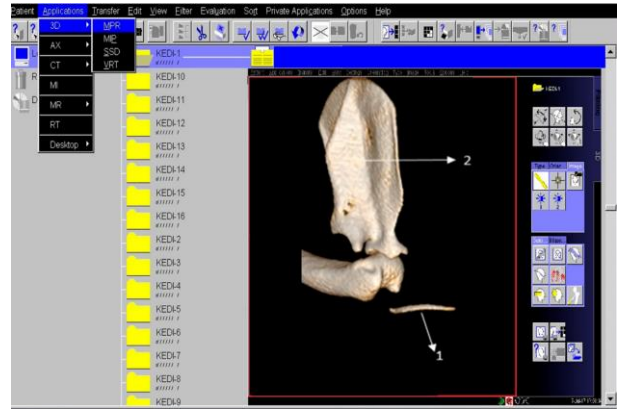
Görüntülerin 3 boyutlu (3B) rekonstrüksiyonları iş istasyonunda bulunan Syngo CT software kapsamındaki "volume rendering plus InSpace MPR" yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. 3B görüntü rekonstrüksiyonları 0,75 mm kalınlıkta oluşturuldu.

Üç boyutlu rekonstrüksiyon görüntülerinin değerlendirilmesi

İş istasyonundaki yazılım programı kullanılarak, elde edilen 3B rekonstrüksiyon görüntülerindeki yapılar; anatomik, morfometrik ve volümetrik olarak değerlendirildi.

a. Anatomik Değerlendirme: Üç boyutlu rekonstrüksiyonu gerçekleştirilen clavícula ve scapula'nın öncelikle yazılım programı kullanılarak bağlantı yerlerinden ayrılması sağlandı. Daha sonra kemikler üzerinde yer alan yapıların, anatomik özellikleri bakımında morfolojik olarak değerlendirilmeleri yapıldı.

b. Morfometrik Değerlendirme: Anatomik yapıdaki morfometrik ölçümler (uzunluk, çap, en, boy vs.), iş istasyonu üzerindeki görüntülerden ve oluşturulmuş 3B rekonstrüksiyon imajlarından elektronik caliperler ile yapıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Van kedilerinde clavícula (1) ve scapula (2) kemiklerine ait rekonstrüksiyon görüntülerinden morfometrik ölçüm değerlerinin alınması işlemi.

Figure 1. The process of obtaining morphometric measurement values from the reconstruction images of the clavícula (1) and scapula (2) bones in Van cats

Kemikler üzerindeki noktaların morfometrik ölçümleri yapılırken referans noktaları literatürler (Von Den Driesch, 1976) temel alınarak, şu şekilde belirlendi:

b.1. Clavícula'nın morfometrik ölçümleri için kullanılan referans noktaları:

Uzunluk (cm): Clavícula'nın proximal ucu ile distal ucu arasındaki mesafe; Genişlik (cm): Clavícula'nın orta noktasının kesitsel görüntüsündeki latero-medial uzaklığı

b.2. Scapula'nın morfometrik ölçümleri için kullanılan referans noktaları:

Uzunluk (cm): Margo dorsalis'in en uç noktası ile acromion'un ucu arasındaki mesafe; Genişlik (cm): Margo cranialis ile margo caudalis arasındaki mesafe; Collum scapulae'nin çapı (cm): Collum scapulae'nin cranio-caudal uzaklığı; Spina scapulae'nin uzunluğu (cm): Spina scapulae'nin margo dorsalis'teki sonlanan noktası ile acromion'un ucu arasındaki mesafe; Spina scapulae'nin yüksekliği (cm): Spina scapulae'nin orta kısmının dorso-

ventral uzaklığı; Fossa supraspinata'nın genişliği (cm): Spina scapula'nın orta noktası ile margo cranialis'in orta noktası arasındaki uzaklık; Fossa infraspinata'nın genişliği (cm): Spina scapula'nın orta noktası ile Margo caudalis'in orta noktası arasındaki uzaklık; Tuberculum supraglenoidale'nin uzunluğu (cm): Tuberculum supraglenoidale'nin cranio-caudal uzaklığı; Cavitas glenoidalis'in çapı (cm): Cavitas glenoidalis'in cranio-caudal uzaklığı; Proc. suprahamatus'un uzunluğu (cm): Proc. suprahamatus'un cranio-caudal uzaklığı

c. Volümetrik Değerlendirme: Clavicula ve scapula'ya ait volüm ölçümlerini yapabilmek amacıyla, iş istasyonu üzerinde görüntülerden her bir kemiksel yapı için, kemiğin girdiği tüm kesitler kemik korteksini de içine alacak şekilde çizildi. Çizilen kemik konturları iş istasyonunda bulunan Syngo CT software kapsamındaki "BT volüm uygulaması (CT volume applications)" aracılığıyla birleştirilerek volümetrik ölçümler elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Van Kedilerinde clavicula (1) ve scapula (2) kemiklerine ait rekonstrüksiyon görüntülerinden volümetrik ölçüm değerlerinin alınması işlemi.

Figure 2. The process of taking volumetric measurement values from the reconstruction images of the clavicle (1) and scapula (2) bones in Van Cats.

İstatiksel Analiz

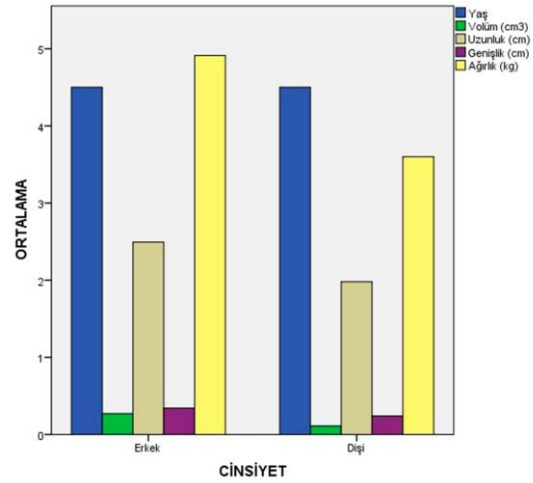
Çalışmada, Van kedilerindeki clavicula ve scapula kemiklerinin bilgisayarlı tomografiyle üç boyutlu olarak incelenmesi sonucunda elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edildi. Kedilerin clavicula ve scapula'sından ölçülen sürekli değişkenler bakımından grupları karşılaştırmada; normallik varsayımının sağlandığı özellikler için Student t testi, sağlanmadığı özellikler için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bu değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede normallik varsayımının sağlanıp sağlanmadığına göre gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Pearson veya Spearman korelasyon katsayıları hesaplandı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, Ver: 13) istatistik paket programı kullanıldı. Çalışmada terminolojik terimler için Nomina Anatomica Veterinaria (Nomina Anatomica Veterinaria, 2017) esas alındı. Ayrıca çalışmada kullanılan kedilerin kilo ölçümleri için digital terazi (TESS®, RP-LCD, Çomak Terazi, İstanbul) kullanıldı.

BULGULAR

Clavicula'nın Morfolojik, Morfometrik ve Volümetrik Değerlendirilmesi

Clavicula'nın humerus'un proximal ucunun hemen önünde yer aldığı belirlendi. Erkeklerde ortalama 2,49 cm, dişilerde ortalama 1,98 cm uzunluğunda olduğu tespit edildi. Ayrıca clavicula'nın iskelet kemiklerinden bağımsız, küçük ve hafif kavisli bir kemik olduğu görüldü. Cinsiyete

göre clavicula ölçüm değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre kedilerdeki clavicula'nın volüm, uzunluk ve genişlik değerlerinin erkek kedilerde dişi kedilere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu farkların istatistik olarak önemli düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Tablo 2'de, kedilerdeki clavicula ölçüm değerleri ile yaş, ağırlık ve volüm değerleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır. Buna göre erkek kedilerin total ağırlığı ile clavicula'nın uzunluğu arasında önemli bir ilişkiye rastlanmıştır ($p < 0.01$). Fakat bu durum dişi kedilerde aynı değildir. Benzer şekilde dişilerde clavicula'nın genişliği ile yaş arasında da ilişki önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer ölçümlere ait ilişki önemli bulunmamıştır. Şekil 3'te, Clavicula ölçüm değerlerinin cinsiyete göre dağılımı verilmiştir. Genel olarak erkek kedilerde bu değerlerin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



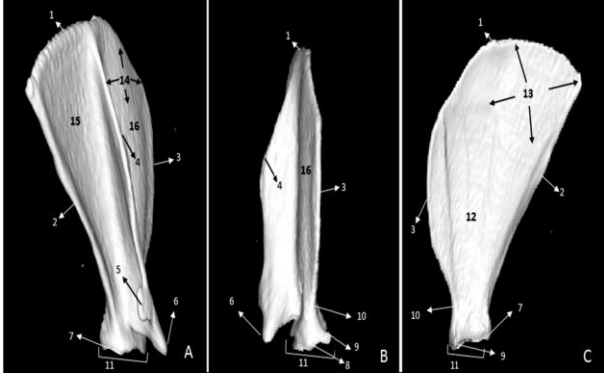
Şekil 3. Clavicula değerlerinin cinsiyete göre dağılımı.

Figure 3. The distribution of Clavicula values by gender.

Scapula'nın Morfolojik, Morfometrik ve Volümetrik Değerlendirilmesi

Scapula'nın üç kenarı (margo dorsalis, margo cranialis, margo caudalis), üç açısı (angulus cranialis, angulus caudalis, angulus ventralis), iki yüzü (facies lateralis, facies medialis) olan, yassı ve üçgen şeklinde bir kemik olduğu gözlemlendi. Scapula'nın facies costalis'inde; belirgin olarak şekillenmiş olan fossa subscapularis ile çok belirgin olmayan facies serrata'ların varlığı tespit edildi. Facies lateralis'de; margo dorsalis'in orta noktasından başlayarak bu yüzün orta 1/2'sine kadar yükselen, daha sonraki seyri sabit bir yüksekliği koruyarak devam ettiren spina scapulae görüldü. Spina scapulae'nin seyri boyunca çok az belirgin olarak tuber spinae scapulae'nin varlığına rastlanıldı. Spina scapula'nın ön ve üst tarafında fossa supraspinata'nın şekillendiği görüldü. Benzer şekilde aynı çıkıntının arka ve alt tarafında fossa infraspinata'nın şekillendiği görüldü. Yapılan ölçüm değerleri sonucunda fossa infraspinata'nın genişliğinin fossa supraspinata'nın genişliğinden çok az bir farkla büyük olduğu saptandı. Spinae scapulae'nin distal ucunda şekillenmiş olan acromion'un cavitas glenoidalis sınırını hafif aştığı tespit edildi. Acromion'un uç kısmında proc. hamatus ve margo caudalis'e doğru yönelmiş belirgin bir proc. suprahamatus'un varlığı tespit edildi. Scapula'nın margo dorsalis'inin margo cranialis'e doğru yaklaştıkça kalınlığı azalan bir eğim göstermekte olduğu gözlemlendi. Bu eğimden dolayı margo caudalis'in margo cranialis'ten daha uzun olduğu belirlendi. Margo cranialis'in margo caudalis'ten daha ince ve keskin bir kenar olduğu görüldü. Margo cranialis ve margo caudalis, angulus ventralis bölgesinde birbirine yaklaşmış, daralarak collum scapulae'yi meydana

getirdiği gözlemlendi. Margo cranialis'in alt tarafında inc. scapulae'nin geniş bir çentik olarak şekillendiği tespit edildi. Angulus ventralis bölgesindeki cavitatis glenoidalis üzerinde belirgin bir inc. glenoidalis'in varlığına rastlanılmadı. Bununla birlikte gayet belirgin bir tuberculum supraglenoidale ve burasının üzerinde mediale doğru yönelmiş proc. coracoideus tespit edildi. Benzer şekilde bu anatomik çıkıntının arka kenarının üst tarafında az belirgin bir tuberculum infraglenoidale gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Van Kedilerinde scapula'nın rekonstrüksiyon görüntüsü. A- Scapula'nın lateral'den görünüşü; B- Scapula'nın cranial'den görünüşü; C- Scapula'nın medial'den görünüşü. (1- Margo dorsalis, 2- Margo caudalis, 3- Margo cranialis, 4- Spina scapulae, 5- Proc. suprahamatus, 6- Proc. hamatus, 7- Tuberculum infraglenoidale, 8- Tuberculum supraglenoidale, 9- Proc. crocoideus, 10- Inc. Scapulae, 11- Cavitas glenoidalis, 12- Fossa subscapularis, 13- Angulus caudalis, 14- Angulus cranialis, 15- Fossa infraspinata, 16- Fossa supraspinata

Figure 4. Reconstruction view of scapula in Van Cats. A- Scapula's view from lateral; B- Scapula's view from cranial; C- Scapula's medial view. (1- Margo dorsalis, 2- Margo caudalis, 3- Margo cranialis, 4- Spina scapulae, 5- Proc. Suprahamatus, 6- Proc. Hamatus, 7- Tuberculum infraglenoidale, 8- Tuberculum supraglenoidale, 9- Proc. Crocoideus, 10 - Inc. Scapulae, 11- Cavitas glenoidalis, 12- Fossa subscapularis, 13- Angulus caudalis, 14- Angulus cranialis, 15- Fossa infraspinata, 16- Fossa supraspinata

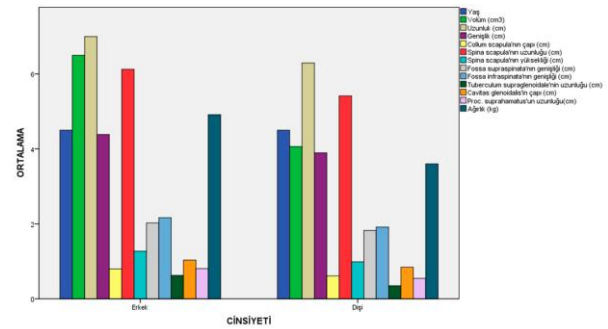
Tablo 1. Cinsiyete göre clavicula değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırılması.

Table 1. Descriptive statistics and comparison of clavicula values by gender.

| | | N | Ort. | Std. Sap. | Min. | Max. | *p. |
|--------------------------|-------|----|----------|-----------|--------|--------|-------|
| Yaş | Erkek | 8 | 4.500 | .7559 | 4.0 | 6.0 | 1.000 |
| | Dişi | 8 | 4.500 | .7559 | 4.0 | 6.0 | |
| | Total | 16 | 4.500 | .7303 | 4.0 | 6.0 | |
| Ağırlık (gr) | Erkek | 8 | 4912.500 | 591.4570 | 4100.0 | 6000.0 | .001 |
| | Dişi | 8 | 3600.000 | 481.0702 | 3100.0 | 4300.0 | |
| | Total | 16 | 4256.250 | 854.7660 | 3100.0 | 6000.0 | |
| Volüm (cm ³) | Erkek | 8 | .2713 | .05768 | .20 | .34 | .001 |
| | Dişi | 8 | .1113 | .02748 | .08 | .16 | |
| | Total | 16 | .1913 | .09344 | .08 | .34 | |
| Uzunluk (cm) | Erkek | 8 | 2.49388 | .481967 | 1.744 | 3.326 | .012 |
| | Dişi | 8 | 1.97975 | .143298 | 1.789 | 2.183 | |
| | Total | 16 | 2.23681 | .434134 | 1.744 | 3.326 | |
| Genişlik (cm) | Erkek | 8 | .34325 | .078043 | .253 | .472 | .007 |
| | Dişi | 8 | .24138 | .046285 | .176 | .306 | |
| | Total | 16 | .29231 | .081300 | .176 | .472 | |

* Mann-Whitney U testi sonuçları; p<0.05 olanlar istatistik olarak anlamlı (önemli) bulunmuştur.

Cinsiyete göre scapula ölçüm değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Buna göre kedilerdeki ağırlık, scapula'ya ait volüm, uzunluk, genişlik, collum scapula'nın çapı, spina scapula'nın uzunluğu, spina scapula'nın yüksekliği, fossa supraspinata'nın genişliği, fossa infraspinata'nın genişliği, tuberculum supraglenoidale'nin uzunluğu, cavitatis glenoidalis'in çapı ve proc. suprahamatus'un uzunluğu değerlerinin erkek kedilerde dişi kedilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu farklar istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Tablo 4'te, kedilerdeki scapula ölçüm değerleri ile yaş, ağırlık ve volüm değerleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır. Buna göre erkek kedilerde scapula'nın genişlik ve proc. suprahamatus'un uzunluk değerleri ile kedinin total ağırlığı arasında önemli bir ilişkiye rastlanmıştır (p<0.05). Fakat bu durumun dişi kedilerde aynı olmadığı görülmüştür. Erkeklerde collum scapula'nın çapı ile yaş arasındaki ilişkinin önemli olduğu görülmüştür (p<0.05). Ayrıca erkek kedilerde, fossa supraspinata'nın genişliği ile scapula'nın volüm değerleri arasındaki ilişki önemli bulunmuştur (p<0.01). Benzer şekilde erkeklerde fossa infraspinata'nın genişliği ile yaş arasındaki korelasyonun önemli olduğu gözlenmiştir (p<0.01). Erkek ve dişi kedilerin diğer ölçüm değerlerine ait ilişkinin önemli düzeyde olmadığı görülmüştür. Şekil 5'te, scapula ölçüm değerlerinin cinsiyete göre dağılımı verilmiştir. Genel olarak erkek kedilerde dişilere oranla bu değerlerin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5. Scapula değerlerinin cinsiyete göre dağılımı.

Figure 5. Distribution of Scapula values by gender.

Tablo 2. Cinsiyete göre clavicula değerleri arasındaki ilişki (korelasyon).**Table 2.** Relationship between the clavicula values by gender (correlation).

| *(p<0.05);**.(p<0.01) | Erkek (n=8) | | | Dişi (n=8) | | | |
|--------------------------|-------------|--------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------------|-------|
| | Yaş | Ağırlık (gr) | Volüm (cm ³) | Yaş | Ağırlık (gr) | Volüm (cm ³) | |
| Yaş | R | 1.000 | -.225 | .159 | 1.000 | -.397 | .207 |
| | P | . | .592 | .707 | . | .331 | .622 |
| Ağırlık (gr) | R | -.225 | 1.000 | .565 | -.397 | 1.000 | .430 |
| | P | .592 | . | .145 | .331 | . | .287 |
| Volüm (cm ³) | R | .159 | .565 | 1.000 | .207 | .430 | 1.000 |
| | P | .707 | .145 | . | .622 | .287 | . |
| Uzunluk (cm) | R | -.137 | .878** | .443 | .316 | .120 | .539 |
| | P | .745 | .004 | .272 | .446 | .776 | .168 |
| Genişlik (cm) | R | -.316 | .586 | .228 | -.729* | .253 | -.228 |
| | P | .446 | .127 | .588 | .040 | .545 | .588 |

Tablo 3. Cinsiyete göre scapula değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırılması.**Table 3.** Descriptive statistics and comparison of scapula values by gender.

| | | N | Ort. | Std. Sap. | Min. | Max. | *p. |
|--|-------|----|----------|-----------|--------|--------|-------|
| Yaş | Erkek | 8 | 4.500 | .7559 | 4.0 | 6.0 | |
| | Dişi | 8 | 4.500 | .7559 | 4.0 | 6.0 | 1.000 |
| | Total | 16 | 4.500 | .7303 | 4.0 | 6.0 | |
| Ağırlık (gr) | Erkek | 8 | 4912.500 | 591.4570 | 4100.0 | 6000.0 | |
| | Dişi | 8 | 3600.000 | 481.0702 | 3100.0 | 4300.0 | .001 |
| | Total | 16 | 4256.250 | 854.7660 | 3100.0 | 6000.0 | |
| Volüm (cm ³) | Erkek | 8 | 6.4975 | .71412 | 5.31 | 7.39 | |
| | Dişi | 8 | 4.0638 | .38693 | 3.52 | 4.63 | .001 |
| | Total | 16 | 5.2806 | 1.37381 | 3.52 | 7.39 | |
| Uzunluk (cm) | Erkek | 8 | 6.99625 | .336322 | 6.480 | 7.490 | |
| | Dişi | 8 | 6.29088 | .422940 | 5.756 | 6.997 | .002 |
| | Total | 16 | 6.64356 | .518598 | 5.756 | 7.490 | |
| Genişlik (cm) | Erkek | 8 | 4.38450 | .293454 | 3.985 | 4.909 | |
| | Dişi | 8 | 3.89400 | .104709 | 3.693 | 4.061 | .001 |
| | Total | 16 | 4.13925 | .330849 | 3.693 | 4.909 | |
| Collum scapula'nın çapı (cm) | Erkek | 8 | .79813 | .061957 | .710 | .870 | |
| | Dişi | 8 | .60975 | .042610 | .535 | .675 | .001 |
| | Total | 16 | .70394 | .110006 | .535 | .870 | |
| Spina scapula'nın uzunluğu (cm) | Erkek | 8 | 6.12375 | .336126 | 5.639 | 6.642 | |
| | Dişi | 8 | 5.41450 | .462204 | 4.874 | 6.100 | .003 |
| | Total | 16 | 5.76913 | .535315 | 4.874 | 6.642 | |
| Spina scapula'nın yüksekliği (cm) | Erkek | 8 | 1.27100 | .108932 | 1.070 | 1.383 | |
| | Dişi | 8 | .98575 | .057933 | .927 | 1.072 | .001 |
| | Total | 16 | 1.12838 | .169711 | .927 | 1.383 | |
| Fossa supraspinata'nın genişliği (cm) | Erkek | 8 | 2.02525 | .101937 | 1.921 | 2.177 | |
| | Dişi | 8 | 1.82250 | .091742 | 1.611 | 1.905 | .001 |
| | Total | 16 | 1.92388 | .140495 | 1.611 | 2.177 | |
| Fossa infraspinata'nın genişliği (cm) | Erkek | 8 | 2.16450 | .192641 | 1.959 | 2.507 | |
| | Dişi | 8 | 1.91425 | .061979 | 1.810 | 2.004 | .004 |
| | Total | 16 | 2.03938 | .189238 | 1.810 | 2.507 | |
| Tuberculum supraglenoidale'nin uzunluğu (cm) | Erkek | 8 | .62400 | .044233 | .564 | .677 | |
| | Dişi | 8 | .34838 | .026971 | .311 | .386 | .001 |
| | Total | 16 | .48619 | .146666 | .311 | .677 | |
| Cavitas glenoidalis'in çapı (cm) | Erkek | 8 | 1.03288 | .061397 | .914 | 1.118 | |
| | Dişi | 8 | .84463 | .069937 | .762 | .982 | .001 |
| | Total | 16 | .93875 | .116154 | .762 | 1.118 | |
| Proc. suprahamatus'un uzunluğu (cm) | Erkek | 8 | .80525 | .107825 | .654 | .951 | |
| | Dişi | 8 | .54613 | .030352 | .510 | .597 | .001 |
| | Total | 16 | .67569 | .154146 | .510 | .951 | |

Tablo 4. Cinsiyete göre scapula değerleri arasındaki ilişki (korelasyon).**Table 4.** Relationship between scapula values by gender (correlation).

| | Erkek (n=8) | | | Dişi (n=8) | | | |
|--|-------------|--------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------------|-------|
| | Yaş | Ağırlık (gr) | Volüm (cm ³) | Yaş | Ağırlık (gr) | Volüm (cm ³) | |
| Yaş | R | 1.000 | -.225 | -.151 | 1.000 | -.397 | .674 |
| | P | . | .592 | .721 | . | .331 | .067 |
| Ağırlık (gr) | R | -.225 | 1.000 | .537 | -.397 | 1.000 | -.012 |
| | P | .592 | . | .170 | .331 | . | .977 |
| Volüm (cm ³) | R | -.151 | .537 | 1.000 | .674 | -.012 | 1.000 |
| | P | .721 | .170 | . | .067 | .977 | . |
| Uzunluk (cm) | R | .082 | -.439 | .143 | .399 | -.012 | .238 |
| | P | .846 | .276 | .736 | .328 | .977 | .570 |
| Genişlik (cm) | R | -.567 | .736* | .383 | .055 | .000 | .286 |
| | P | .143 | .037 | .349 | .897 | 1.000 | .493 |
| Collum scapula'nın çapı (cm) | R | -.729* | .293 | .381 | .096 | -.072 | .286 |
| | P | .040 | .482 | .352 | .821 | .865 | .493 |
| Spina scapula'nın uzunluğu (cm) | R | .302 | -.220 | -.119 | .591 | -.133 | .333 |
| | P | .467 | .601 | .779 | .123 | .754 | .420 |
| Spina scapula'nın yüksekliği (cm) | R | .536 | .366 | .071 | -.082 | -.084 | .143 |
| | P | .171 | .373 | .867 | .846 | .843 | .736 |
| Fossa supraspinata'nın genişliği (cm) | R | -.151 | .634 | .905** | .674 | -.566 | .571 |
| | P | .721 | .091 | .002 | .067 | .143 | .139 |
| Fossa infraspinata'nın genişliği (cm) | R | -.866** | .317 | .048 | -.179 | .313 | .143 |
| | P | .005 | .444 | .911 | .672 | .450 | .736 |
| Tuberculum supraglenoidale'nin uzunluğu (cm) | R | -.674 | .171 | .381 | .151 | .217 | .167 |
| | P | .067 | .686 | .352 | .721 | .606 | .693 |
| Cavitas glenoidalis'in çapı (cm) | R | .674 | -.293 | -.333 | .192 | .145 | .429 |
| | P | .067 | .482 | .420 | .648 | .733 | .289 |
| Proc. suprahamatus'un uzunluğu (cm) | R | -.550 | .781* | .357 | .495 | -.265 | .262 |
| | P | .158 | .022 | .385 | .212 | .526 | .531 |

*. Spearman korelasyon katsayısı önemli bulunmuştur ($p < 0.05$); **. Spearman korelasyon katsayısı önemli bulunmuştur ($p < 0.01$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmalarda clavícula'nın kuşlarda (Dursun 2002b), sürüngenlerde (reptilia) ve ilkel memelilerde (monotremata) tam olarak teşekkül ettiği (Bahadır ve Yıldız 2008), tavşanlarda (Düzler ve Çakır 2003), guinea piglerde, ratlarda (Özkan 2002), wombatlarda ortak bir özellik olarak bulunduğu (Saber 2013), ruminant ve equide gibi tırnaklı hayvanlarda m. brachiocephalicus'un içerisinde fibröz bir çizgi haline gelerek kaybolduğu (Bahadır ve Yıldız 2008), lemur (Makungu ve ark. 2015), kirpi (Özkan 2004; Hashemi ve ark. 2009) gibi hayvanlarda manubrium sterni ile scapula arasında uzandığı, köpeklerde yaklaşık 1 cm, kedilerde yaklaşık 2-5 cm (Liebich ve ark. 2015), aslanlarda yaklaşık 8,5 cm (Eren ve ark. 2001) uzunluğunda olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada ise, clavícula'nın humerus'un proximal ucunun hemen önünde, erkeklerde ortalama 2,49 cm, dişilerde ortalama 1,98 cm uzunluğunda, iskelet kemiklerinden bağımsız, küçük ve hafif kavisli bir kemik olduğu tespit edilmiştir.

Scapula'nın facies costalis'inde Girgin ve ark. (1988)'ları, köpek ve kurtta fossa subscapularis'in, scapula'nın proximal 1/3'ünde belirgin bir linea ile kesildiğini, tilkilerde ise bu linea'nın silik bir şekilde bulunduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde sansarlarda (Atalar ve Karan 2002) ve sincaplarda (Karan ve Atalar 2003) yine bu yüz üzerinde

NAV'da ismi bulunmayan çok belirgin bir crista ve kemik çıkıntılarının bulunduğu tespit edilmesine rağmen yapılan çalışmada böyle oluşumlara rastlanılmamıştır. Bununla birlikte mevcut çalışmada bu yüz üzerinde belirgin bir fossa subscapularis'in varlığı literatür verileriyle uyum göstermektedir (Evans ve Christensen 1979; Tecirlioğlu 1983; Dursun 2002a; Adams 2004; Özkan 2004; Bahadır ve Yıldız 2008; Kahraman 2012; Karan 2012; Saber 2013; Tobechukwu ve ark. 2015).

Köpek (Dursun 2002a), kedi (Bahadır ve Yıldız 2008), rat (Kahraman 2012), wombat (Saber 2013), grasscutter (Tobechukwu ve ark. 2015) scapula'sında fossa supraspinata ile fossa infraspinata'nın eşit genişlikte olduğu, kirpi (Özkan 2004), oklu kirpi (Yılmaz ve ark. 1998), sansar (Atalar ve Karan 2002), su samurları (Yılmaz ve ark. 1999), Hint kaplanı (Mahapatra ve ark. 2016) ve sincaplarda (Karan ve Atalar 2003) fossa supraspinata'nın fossa infraspinata'dan, mole-rat (Özkan 2002), lemur (Makungu ve ark. 2015), yaban domuzu (Karan 2012) ve tavşanlarda (Özkan ve ark. 1997) ise fossa infraspinata'nın fossa supraspinata'dan daha geniş olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada mole-rat, lemur, yaban domuzu ve tavşanlarda olduğu gibi fossa infraspinata'nın fossa supraspinata'dan geniş olduğu tespit edilmiştir.

Girgin ve ark. (1988)'ları kurt ve tilki'de spinae scapulae'nin distal ucunda şekillenmiş olan acromion'un proc. hamatus'unun cavitas glenoidealis sınırını aştığını,

köpekte ise bu sınırdaki kaldığını bildirmiştir. Yapılan çalışmada ise proc. hamatus'un kurt ve tilkilerdeki gibi cavitas glenoidalis sınırını hafif aştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada tespit edilen acromion'un ucundaki margo caudalis'e doğru yönelmiş proc. suprahamatus'un, evcil carnivor'lardan kedilerde (Evans ve Christensen 1979; Dursun 2002a), su samurlarında (Yılmaz ve ark. 1999), porsuklarda, sansarlarda (Atalar ve Karan 2002), sincaplarda (Karan ve Atalar 2003), ratlarda (Özkan 2002), tavşanlarda (Özkan ve ark. 1997), kirpilerde (Özkan 2004), oklu kirpilerde (Yılmaz ve ark. 1998), pandalarda, wombatlarda (Saber 2013), Hint kaplanı'nda (Mahapatra ve ark. 2016), aslanlarda (Kirberger ve ark. 2005) ve mirketlerde (Staden 2014) bulunduğu tespit edilmesine rağmen; yerli tilki, çakal, yerli köpek (Gültekin ve Uçar 1980) ve lemur (Makungu ve ark. 2015) üzerinde yapılan çalışmalarda proc. suprahamatus'un bulunmadığı tespit edilmiştir.

Özkan (2002) mole-ratlar üzerinde yaptığı çalışmada scapula'nın angulus ventralis bölgesinde inc. glenoidalis ve proc. coracoideus'un iyi geliştiğini, tuberculum supraglenoidalis'in tuberculum infraglenoidalis'ten daha büyük olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde kirpi (Özkan 2004), oklu kirpi (Yılmaz ve ark. 1998), sansar (Atalar ve Karan 2002), tavşan (Özkan ve ark. 1997) ve sincap (Karan ve Atalar 2003) scapula'sında da proc. coracoideus'un belirgin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Atalar ve Karan (2002) sansarlarda, Karan ve Atalar (2003) sincaplarda inc. scapula ve inc. glenoidalis'in oldukça belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada da tuberculum infraglenoidale'ye göre gayet belirgin bir tuberculum supraglenoidale ve burasının üzerinde mediale doğru yönelmiş belirgin bir proc. coracoideus tespit edilmiştir. Ayrıca inc. scapulae'nin geniş bir çentik olarak şekillenmesine rağmen, belirgin bir inc. glenoidalis şekillenmemiştir.

Scapula'nın şekli ve büyüklüğü hayvanın lokomotif yapısını yansıtmaktadır. Scapula çalışan (iş gücü üreten) memelilerde genellikle adım uzunluğunu artırmaya olanak sağlayacak şekilde uzun, dar ve vertical yönlü olarak; gezici memelilerde dar, ama horizontal yönlü olarak; kazıcı ve yüzen memelilerde ise büyük bir üçgen şeklinde bulunur. Aynı zamanda scapula'nın angulus caudalis kısmı kazıcı ve yüzen memelilerde nispeten genişlemiştir. Bu durum ön bacağın addüksiyonunu sağlayan ve angulus caudalis'ten başlayan m. teres major'un daha güçlü addüksiyon sağlamasına olanak vermektedir. Ayrıca bazı kazıcı ve yüzen memelilerin scapula'sında zayıf ikincil bir spina scapulae bulunabilmektedir (Polly 2007). Van kedilerinin scapula'sının üçgen şekilde olması, margo dorsalis'inin margo cranialis'e doğru yaklaştıkça azalan bir kalınlık ve eğim göstermekte olması itibarıyla kazıcı ve yüzücü memeli scapula'sının özelliğini göstermekte olup, yapılan çalışmada ikincil bir spina scapulae'ye rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak; Van kedilerinde clavícula ve scapula kemikleri anatomik özellikleri bakımından incelendi. Bu kemiklerden alınan morfometrik ve volümetrik ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak erkek ve dişiler arasındaki farklılıkları tespit edildi. Ayrıca bu çalışmanın, Van kedilerinde iskelet sistemi ile ilgili anatomi eğitimi başta olmak üzere, cerrahi ve klinik uygulama alanlarında veteriner hekimlere ve eğitim alan öğrencilere, antropoloji alanındaki çalışmalara faydalı olabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, birinci yazarın "Van Kedilerinde Ön Bacak İskeletinin Bilgisayarlı Tomografi ile Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi" isimli doktora tezinin bir bölümünden oluşmaktadır ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-5905 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca, 26-29 Ekim 2019 tarihinde Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde düzenlenen 2nd International & 11th National Veterinary Anatomy Congress'de sözlü bildiri olarak sunulmuştur ve kongre kitapçığında özet olarak basılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adams DR (2004). Musculoskeletal System. Canine Anatomy: A Systemic Study. Fourth Edition, Iowa State Press, 35-82.
- Atalar Ö, Karan M (2002). Sansar (Martes foina) iskelet sistemi üzerinde makro-anatomik araştırmalar. I. Ossa membri thoracici. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 16, 2, 229-232.
- Bahadır A, Yıldız H (2008). Veteriner Anatomi: Hareket Sistemi & İç Organlar. Ezgi Kitabevi, Bursa.
- Brenton H, Hernandez J, Bello F et al. (2007). Using multimedia and web 3D to enhance anatomy teaching. *Comput Educ*, 49, 32-53.
- Dursun N (2002a). Veteriner Anatomi I. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Dursun N (2002b). Evcil Kuşların Anatomisi. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Düzler A, Çakır A (2003). Postnatal development of the thoracic limb bones in New Zealand rabbit. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 165-172.
- Eren G, Yıldız B, Sönmez G (2001). Aslan clavicularının morfometrik ve histolojik incelenmesi: morphological and histological investigation of lion clavicle. *J Fac Vet Med*, 20, 133-135.
- Evans HE, Christensen GC (1979). Miller's Anatomy of the Dog. Philadelphia. WB Saunders Company.
- Girgin A, Karadag H, Bilgiç S, Temizer A (1988). Kurt (Canis lupus) ve tilki (Canis vulpes) iskelet kemiklerinin yerli köpeğinkilerine (Canis familiaris) göre gösterdikleri makro-anatomik ayrımlar üzerine araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Vet Fak Dergisi*, 4, 1, 169-182.
- Gültekin M, Uçar Y (1980). Yerli tilki (Canis vulpes) ve çakal (Canis sureus) iskelet kemiklerinin yerli köpeğinkilerine (Canis familiaris) göre gösterdikleri makro-anatomik ayrımlar üzerinde araştırmalar. Bölüm 1: Truncus ve membra. *AÜ Vet Fak Dergisi*, 27, 1-2, 201-214
- Hashemi M, Javadi S, Hadian M, Pourreza B, Behfar M (2009). Radiological investigations of the Hedgehog (Erinaceus concolor) appendicular skeleton. *J Zoo Wildl Med*, 40, 1-7.
- Kahraman S (2012). Ratlarda ossa membri thoracici'nin bilgisayarlı tomografi görüntülerinin üç boyutlu modellenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Kalra MK, Maher MM, Toth TL et al. (2004). Strategies for CT radiation dose optimization. *Radiology*, 230, 619-28.
- Karan M (2012). Yaban domuzlarında (Sus scrofa) ön bacak kemiklerinin makro-anatomik olarak incelenmesi. *FÜ Sağlık Bil Vet Derg*, 26, 1, 17 - 20.
- Karan M, Atalar Ö (2003). Sincap (Sciurus vulgaris) iskelet sistemi üzerinde makroanatomik araştırmalar I. Ossa membri thoracici. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 17, 1, 35-38.
- Kirberger RM, Plessis WM, H. Turner PH (2005). Radiologic anatomy of the normal appendicular skeleton of the lion (Panthera leo). Part 1: Thoracic limb. *J Zoo Wildl Med*, 36, 1, 21- 28.
- Liebich HG, Maierl J, König HE (2015). Ön Bacaklar (Membra Thoracica). İçinde HE König, HG Liebich (Ed), Kürtül İ., Türkmenoğlu İ. (Çev. Ed), Veteriner Anatomi (Evcil Memeli Hayvanlar). 6. Baskı, Medipres, 151-222, Malatya.
- Mahapatra A, Pathak SK, Amarपाल, Pawde AM (2016). Morphological and certain morphometrical study of scapula of Indian Tiger. *Indian J Vet Anatomy*, 28, 2, 77-79.
- Makungu M, Groenewald HB, Plessis WM, Barrows M, Koepfel KN (2015). Thoracic limb morphology of the Ring-Tailed Lemur (Lemur catta) evidenced by gross osteology and radiography. *Anat Histol Embryol*, 44, 288-298.
- Nomina Anatomica Veterinaria (2017). Prepared by the international committee on veterinary gross anatomical nomenclature and authorized by the general assembly of the world association of veterinary anatomists (6th Edition). The Editorial Committee Hanover (Germany), Ghent (Belgium), Columbia, MO (U.S.A.), Rio de Janeiro (Brazil).

- Odabaşıoğlu F, Ateş CT (2000).** Van Kedisi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 1. Baskı, Konya.
- Ohlerth S, Scharf G (2007).** Computed tomography in small animals-basic principles and state of the art applications. *Vet J*, 173, 254-71.
- Ozkadif S, Haligur A, Eken E (2019).** A three-dimensional reconstruction of the scapula in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Indian J Anim Res*, 53, 336-340.
- Özkan ZE (2002).** Macro-anatomical investigations on the forelimb skeleton of Mole-Rat (*Spalax leucodon nordmann*). *Vet Arhiv*, 72, 2, 91-99.
- Özkan ZE (2004).** Kirpi (*Erinaceus europaeus*) iskelet sistemi üzerinde makro-anatomik araştırmalar I. Ossa membri thoracici. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 271-274.
- Özkan ZE, Dinç G, Aydın A (1997).** Tavşan (*Oryctolagus cuniculus*), kobay (*Cavia porcellus*) ve ratlarda (*Rattus norvegicus*) scapula, Skeleton brachii ve Skeleton antebrachii'nin karşılaştırmalı gross anatomisi üzerinde incelemeler. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 11, 171-175.
- Polly PD (2007).** Limbs in Mammalian Evolution. In: Fins into Limbs. Evolution, development and transformation, Chapter 15, Hall BK (Ed.). University of Chicago Press, 245-268, Chicago.
- Prokop M (2003).** General principles of MDCT. *Eur J Radiol*, 45, 4-10.
- Randi E, Massimo Pierpaoli M, Beaumont M, Ragni B, Sforzi A (2001).** Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using bayesian clustering methods. *Mol Biol Evol*, 18, 9, 1679-1693.
- Saber AS (2013).** Some morphological observations on the thoracic limb bones of the Hairy-Nosed Wombat (*Lasiorchinus latifornis*, Owen). *J Vet Anat*, 6, 2, 93-109.
- Staden SL (2014).** The thoracic limb of the suricate (*Suricata suricatta*): osteology, radiologic anatomy, and functional morphologic changes. *J Zoo Wildl Med*, 45, 3, 476-486.
- Standing S (2008).** Gray's Anatomy: Pectoral Girdle and Upper limb. The Anatomical Basis of Clinical Practice (Fortieth Edition). Churchill Livingstone Elsevier, 777-790.
- Tecirlioğlu S (1983).** Sırtlan ve köpeğin iskelet kemikleri üzerinde makro-anatomik araştırmalar. *AÜ Vet Fak Derg*, 30, 1, 149-166.
- Tobechukwu OK, Adeniyi OS, Olajide HJ, Tavershima D, Sulaiman SO (2015).** Macro-anatomical and morphometric studies of the Grasscutter (*Thryonomys winderianus*) forelimb skeleton. *Int J Vet Sci Anim Husb*, 2, 1, 006-012.
- Von Den Driesch A (1976).** A guide to the measurement of animal bones from archaeological sites. Peabody Museum Bulletins, Harvard University, The United States of America.
- Yılmaz O (2018).** Three-dimensional investigation by computed tomography of the forelimb skeleton in van cats. Van Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences, Faculty of Veterinary, Department of Anatomy, Van, Turkey.
- Yılmaz S, Dinç G, Özdemir D (1999).** Su samuru (*Lutra lutra*) iskelet sistemi üzerinde makro-anatomik araştırmalar. I. Ossa membri thoracici. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 13, 3, 225-228.
- Yılmaz S, Özkan ZE, Özdemir D (1998).** Oklu kirpi (*Hystrix cristata*) iskelet sistemi üzerine makro-anatomik araştırmalar I. Ossa membri thoracici. *Turk J Vet Anim Sci*, 22, 389-392.



Investigation of Acidity, Diastase Number, HMF, Insoluble Dry Matter and Ash Percentage Values of Some Honey Samples Produced in Bingöl and Districts

Semih YAŞAR¹ İnci SÖĞÜTLÜ²

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Özalp Vocational School, Department of Medical Laboratory Technician, Van, Turkey

² Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Food and Control Department of Food Enterprises and Codex, Ankara, Turkey

Received: 10.10.2019

Accepted: 05.03.2020

ABSTRACT

Bingöl province and its districts are very suitable for beekeeping with rich vegetation and suitable climatic conditions. Eight honey samples were collected from Bingöl province and districts and analyzed. As a result of these analyzes, the mean free acidity was 10.675 meq / kg, the number of diastases was 22.5, the HMF was 45.148 mg / kg, the water-insoluble dry matter was 0.00575% and the ash percentage was 0.45%. The biochemical analysis of the samples shows that the honeys examined meet the criteria of Turkish Food Codex. In order to ensure the development of beekeeping and quality honey production in the region, educational activities, controls and financial support should be increased with various projects.

Keywords: Ash percentage, Diastasis, Flower honey, HMF

ÖZ

Bingöl ve İlçelerinde Üretilen Bazı Bal Örneklerinin Asitlik, Diyastaz Sayısı, HMF, Suda Çözülmeyen Kuru Madde ve Kül Yüzdesi Değerlerinin Araştırılması

Bingöl ili ve ilçeleri zengin bitki örtüsü ve uygun iklim koşulları ile arıcılık için çok uygun bir bölgedir. Sunulan çalışmada Bingöl ve ilçelerinde üretilen bazı bal örneklerinin serbest asitlik, diyastaz sayısı, HMF, suda çözülmeyen kuru madde ve kül yüzdesi ölçülerek sonuçların standartlara uygunluğunun araştırılması amaçlandı. Bingöl ili ve ilçelerinden 8 adet bal örneği toplanarak analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda ortalama serbest asitlik 10.675 meq/kg, diyastaz sayısı 22.5, HMF 45.148 mg/kg, suda çözülmeyen kuru madde %0,00575 ve kül yüzdesi %0,45 olarak bulundu. Örneklerin biyokimyasal analizleri incelenen balların Türk Gıda Kodeksi kriterlerine uyduğunu göstermektedir. Bölgede arıcılığın gelişmesini ve kaliteli bal üretimini sağlayabilmek için eğitimsel faaliyetlerin, kontrollerin ve çeşitli projelerle mali desteğin artırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çiçek balı, Diyastaz, HMF, Kül yüzdesi

GİRİŞ

Bal, arılar (*Apis mellifera*) tarafından çiçeklerden nektarlar toplanarak leziz bir gıda ürününe dönüştürülen, şekerden daha yararlı olduğu bilinen doğal bir üründür (Vanhanen ve ark. 2011). Çoğunlukla şeker (fruktoz ve glikoz) ve enzimler, amino asitler, organik asitler, karotenoidler, vitaminler, mineraller ve aromatik maddeler gibi diğer bileşenlerden oluşan bir besindir. Çok çeşitli biyolojik etkiler gösteren flavonoidler ve fenolik asitler bakımından zengindir ve doğal antioksidanlar gibi davranır (Alqarni ve ark. 2012). Bal üretim kaynağına göre çiçek ve salgı balı olarak sınıflandırılmaktadır. Çiçek balı bitki nektarlarından elde edilir, salgı balı ise bitkilerde bulunan canlı kısımlar üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarından veya yine bitkilerdeki canlı bölümlerin salgılarından elde edilir (TGK 2012). Doğal bir gıda olan bal içerisinde sağlık için yararlı birçok biyoaktif madde bulundurur. Bal içerisine

dışarıdan herhangi bir madde eklenmesi ya da balın bileşimindeki bir maddenin uzaklaştırılması yönetmelik ve kanunlar ile yasaklanmıştır (Karadal ve Yıldırım 2012). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre balda olması istenen bazı özellikleri aşağıda Tablo 1'de verilmiştir (TGK 2012).

Türkiye, bal üretimi için uygun mevsim şartları, topografik yapısı ve zengin bitki florasına sahip nadir ülkelerden biridir. Bingöl ili ise Türkiye'nin doğusunda bulunmakla birlikte coğrafi yapısı ve zengin bitki örtüsüyle Türkiye'nin en verimli ve kaliteli ballarının üretildiği bir ilimizdir. Türkiye Dünyada balı bitki türlerinin dörtte üçüne sahip olmasına rağmen, bal üretimi ve tüketimi bakımından dünyada yerini tam olarak alamamıştır (Şişek ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmada Bingöl ili ve ilçelerinde üretilen balların bazı kimyasal parametrelerinin standartlarla ilişkisi araştırılmaktadır.

Tablo 1. Bal Tebliği'ne (2012/58) göre balın sahip olması gereken özellikleri (TGK 2012)

Table 1. According to the Communiqué on Honey (number: 2012/58), honey should have the characteristics (TGK 2012)

| Özellik (100 g Çiçek balı Salgı balı Karışım balda) | | | |
|---|------|------|------|
| Su (en fazla, g) | 20 | 20 | 20 |
| Sakkaroz (en fazla, g) | 5-10 | 5-10 | 5-10 |
| Fruktoz + glikoz (en az, g) | 60 | 45 | 45 |
| Suda çözülmeyen madde (en fazla, g) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Serbest asitlik (en fazla, meq/kg) | 50 | 50 | 50 |
| Diastaz sayısı (en az) | 8 | 8 | 8 |
| HMF (en fazla, ppm) | 40 | 40 | 40 |
| Prolin miktarı (en az, ppm) | 300 | 300 | 300 |
| Naftalin miktarı (en fazla, ppb) | 10 | 10 | 10 |

Tablo 2. Bingöl ve ilçelerinde üretilen bal örneklerinin analiz sonuçları

Table 2. Analysis of honey samples produced in Bingöl and districts

| | Asitlik (meq/kg) | Diastaz Sayısı | HMF (mg/kg) | Suda Çözülmeyen Madde Miktarı (%) | Kül (%) | Yüzdesi |
|-----------------------|------------------|----------------|-------------|-----------------------------------|---------|---------|
| Bingöl-Karlıova | 25 | 17.9 | 35.315 | 0.007 | 0.42 | |
| Bingöl-Solhan | 20 | 8.3 | 23.595 | 0.009 | 0.54 | |
| Bingöl-Genç | 21 | 10.9 | 36.335 | 0.008 | 0.39 | |
| Bingöl-Merkez | 25 | 23 | 34.725 | 0.001 | 0.43 | |
| Bingöl-Sancak Beldesi | 22.5 | 1 | 28.98 | 0.011 | 0.51 | |
| Bingöl-Yedisu | 23 | 10.9 | 28.92 | 0.002 | 0.47 | |
| Bingöl-Çaytepe köyü | 21.5 | 2.5 | 42.22 | 0.001 | 0.45 | |
| Bingöl-Yayladere | 22 | 10.9 | 27.01 | 0.007 | 0.41 | |
| Ortalama Değer | 10.675 | 22.5 | 45.148 | 0.00575 | 0.45 | |

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bal arılar tarafından üretilen doğal bir gıda olup, diğer arıcılık ürünleri olan propolis, arı sütü, arı zehri, balmumu, polen gibi diğer arı ürünlerine göre temin edilebilirliği ve tüketimi daha yüksektir (Karadal ve Yıldırım 2012). Bu özelliği sebebiyle üzerinde en kolay oynanan gıdalardan biridir. Saf bal hiçbir katkı maddesi olmadan arıların çiçek nektarlarından ürettiği gıdadır. Ancak verimi arttırmak için çeşitli şeker şurupları kullanılarak da bal üretimi yapılmaktadır (Paradkar ve Irudayaraj 2001).

Balın asitliğini içeriğinde bulunan mineral maddeler ve organik asitler, karbonhidratlar ve aminoasitlerdir (Ötles 1995). Asitlik, balın bitkisel kaynağına ve üretim yapılan bölgeye bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Serbest asitlik balın depolanma süresi ve nem içeriğine bağlı olarak biraz artmakta, ancak depolama sıcaklığı ile değişim

MATERYAL ve METOT

Bingöl, Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nde yer alan bir ildir. İlin yüzölçümü 8.004 m²'dir. İl merkezinin denizden yüksekliği 1159 m'dir. Bingöl ilinin genelinde üretilen balların asitlik, diastaz sayısı, HMF, suda çözülmeyen kuru madde ve kül yüzdesi özelliklerini belirlemek amacıyla 2013 yılının Ağustos, Eylül, Ekim ayları içerisinde, Bingöl ve ilçelerinde bal üretimi yapan arıcılardan temin edildi. Bu çalışmada materyal olarak 8 ayrı çiçek balı kullanıldı. Bal örnekleri, ağız kapalı kaplarda toplandı ve analiz süresi boyunca oda sıcaklığında (22°C'de) muhafaza edildi. Muhafaza esnasında bal örneklerine herhangi bir fiziksel veya kimyasal işlem uygulanmadı.

Ballarda serbest asitlik tayini TS 13360' a göre, diastaz sayısı tayini TS 13364'e göre, hidroksi metil furfural (HMF) muhtevası tayini TS 13356'ya göre, suda çözülmeyen kuru madde tayini TS 3036'ya, kül yüzdesi tayini TS 2131'e göre yapılmıştır.

BULGULAR

Bingöl ve ilçelerinde üretilen ballarda asitlik, diastaz sayısı, HMF, suda çözülmeyen kuru madde ve kül yüzdesi analizleri yapıldı. Sonuçlar tablo şeklinde aşağıda verilmiştir.

göstermemektedir (Terrab ve ark. 2004). Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanan bal örneklerinde yapılan bir çalışmada ortalama serbest asitlik değeri 22.3 meq/kg tesbit edilmiştir (Yılmaz ve Küfrevioğlu 2001). Batu ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada toplam asitlik değerlerini 6.73-47.06 meq/kg arasında ve ortalamasını da 32.49 meq/kg olarak belirlemişlerdir. Ülkemizde ayçiçek ballarında yapılan başka bir çalışmada toplam asitlik miktarı ortalama 14.35 meq/kg olarak ölçülmüştür (Velioğlu ve Köse 1983). Gaziantep bölgesinde üretilen çiçek ballarda yapılan başka bir çalışmada ise asitlik değerlerinin ortalama 26.1106 meq/kg olduğu görülmüştür (Kutlu ve Bengü 2015).

Çalışmamızda toplam asitlik bakımından en düşük değer 20 meq/kg ile Bingöl-Solhan, en yüksek değer ise 25 meq/kg ile Bingöl-Karlıova örneklerinden elde edilmiştir. Tüm örneklerin ortalaması 22.5 meq/kg olarak bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre,

baldaki toplam asitlik değeri 50 meq/kg'ı aşmamalıdır. Çalışmamızdaki çiçek ballarının ölçülen asitlik değerlerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygun olduğu tespit edilmiştir.

Diastaz sayısı 40 °C'de 1 saatte 1 gram balın parçaladığı nişastanın gram olarak değeridir (Şahinler ve ark. 2001). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne (2012/58) göre diastaz sayısı ballarda en az 8 olmalıdır. Balın olgunlaştırılması sırasında, bal arıları diyastaz enzimini salgırlar, bu enzim ısı etkisi ile kolay olarak parçalanabilmektedir. Isıya maruz kalan balların diyastaz sayıları hızla azalır, diyastaz sayısı yüksek olan ballarda ise fazla asit oluşumuna bağlı daha çabuk mayalanma oluşmaktadır (Tolon 1999). Balın üretildiği bitkilerin kaynağına ve bölgenin florasına bağlı olarak balda değişik düzeylerde bulunurken, diyastaz sayısının tahmin edilen miktardan az ya da çok tespit edilmesi balın kalitesinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir (Artık 2004).

Batu ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları analiz sonuçlarına göre bal örneklerinin diyastaz sayılarının 8.3-17.9 arasında değiştiğini ve ortalama ise yaklaşık 13.9 olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada çiçek ve salğı ballarının diyastaz sayılarını sırasıyla 22.68 ve 25.29 olarak bulmuşlardır (Sorkun ve ark. 2002). Kutlu ve Bengü (2005) Gaziantep bölgesindeki bal örneklerinde diastaz sayısı ölçümleri sonucunda en düşük 2.5 en yüksek 38.5 ortalama 19.83 olarak değerlerini bulmuşlardır. Yapılan farklı çalışmalarda ise bal örneklerinin diyastaz sayılarının ortalama 14.6 (Tolon 1999), 11.23 (Yılmaz ve Küfrevioğlu 2001), 17.97 (Velioglu ve Köse 1983), 29.40 (Şahinler ve Gül 2007) ve 20.19 (Gül 2008) olarak ölçmüşlerdir.

Çalışmamızda bütün bal numunelerinin diastaz sayıları hesaplanmış. En yüksek diastaz sayısı 17.90 ile Bingöl-Karlıova, en düşük diastaz sayısı ise 1 ile Bingöl-Sancak Beldesi numunelerinde tespit edilmiştir. Bingöl-Sancak Beldesi ve Bingöl- Çaytepe köyü numuneleri hariç diğer tüm numunelerde diastaz sayısı 8'in üzerinde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygun çıkmıştır.

Bal içerisindeki karbonhidratların ısıtılması yada balların ısı bakımından saklama ortamının uygun olmaması durumunda HMF isimli madde oluşur. Bu madde insan sağlığı açısından zararlı bir maddedir. Balın uygunsuz bir şekilde depolanması ve uygulanan ısı işlem, balın içerdiği şekerler ve aminoasitler arasındaki bağa bağlı olarak HMF bileşimini oluşturmaktadır (Zappala ve ark. 2005). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre balda yüksek 40 mg/kg HMF bulunabileceği öngörülmektedir (TGK 2012). Ölçülen değerin bu miktarın üzerinde çıkması balın uygun olmayan sıcak bir ortamda depolandığını ya da ısı işleme maruz kalmış olabileceğini göstermektedir ve bu özellikli balların satışı yasaktır (Zappala ve ark. 2005). Gaziantep bölgesi ballarında yapılan bir çalışmada HMF değeri en az 14.284 mg/kg, en yüksek 51.456 mg/kg ortalama 27.690 mg/kg olarak ölçmüşlerdir (Kutlu ve Bengü 2015). Batu ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada ölçümü yapılan ballardaki HMF değerleri 0,14 mg/kg ile 24.39 mg/kg arasında ortalama olarak 5.50 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda HMF içerikleri ortalama 3.3 mg/kg (Yılmaz ve Küfrevioğlu 2001), 7.84 mg/kg (Sorkun ve ark. 2002), 5.44 (Şahinler ve Gül 2004) ve 17.8 mg/kg (Terrab ve ark. 2002) olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda ölçülen HMF değerlerinin en düşüğü 23.59 mg/kg ile Binöl-Solhan numunesinde en yüksek değer ise 42.22 mg/kg olarak Bingöl-Yedisu numunesinde, ortalama

olarak 32.14 mg/kg olarak ölçüldü. Ölçülen değerlerden sadece Bingöl-Çaytepe Köyü numunesi 42.22 mg/kg değeri ile Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygun çıkmamış kalan numunelerin tümü 40 mg/kg altında olup HMF bakımından standartlara uygun çıkmıştır.

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre balda suda çözülmeyen madde miktarının en çok %0.01 olabileceği söylenmiştir. Kutlu ve Bengü (2015) araştırmalarında Gaziantep bölgesindeki ballarda suda çözülmeyen madde miktarını %0,002 ile %0,093 aralığında ölçmüşler, ortalamasını ise %0,027 olarak bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada bal örneklerindeki suda çözülmeyen madde miktarı %0,01 ile %0,09 arasında, ortalama %0,03 olarak bildirilmiştir (Çetin ve ark. 2011). Çalışmada en düşük suda çözülmeyen madde miktarı % 0.001 ile Bingöl-Merkez, en yüksek değer % 0.011 ile Bingöl-Sancak Beldesi bal örneklerinde ölçülmüştür. Ortalama suda çözülmeyen madde miktarı % 0.00575 olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz tüm sonuçların Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nin maksimum değerinin altında olduğu görülmüştür.

Bal içerisindeki kül içeriğindeki mineral maddelerden kaynaklanmaktadır. Külün miktarı ise arının kaynak olarak kullandığı bitkilere göre farklılık gösterir. Baldaki renk tonuyla içerdiği kül miktarı arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Balın rengi koyulaştıkça içerdiği kül oranı da çoğunlukla artmaktadır (Thawley 1969). Batu ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada analizi yapılan ballarda kül oranının %0.02 ile %0.19 arasında değiştiği, ortalama %0.07 olduğu görülmüştür. Yapılan diğer araştırmalarda analizi yapılan ballarda kül oranları %0.11 (Gül 2008), %0.13 (Şahinler ve Gül 2004) ve %0,19 (Terrab ve ark. 2003) olarak bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği standartlarına göre çiçek ballarında olası kül miktarının %0.6 değerinin altında olması gerekmektedir. Çalışmamızda ölçülen kül miktarlarının en düşüğü % 0.39 ile Binöl-Genç numunesinde en yüksek değer ise % 0.54 olarak Bingöl-Solhan numunesinde, ortalama olarak % 0.45 olarak ölçüldü. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bal numunelerinin tümü Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği standartlarına uymaktadır.

Sonuç olarak ölçülen parametrelere göre Bingöl ili ve ilçelerinden toplanan bal örneklerinin 3 bal örneği haricinde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği standartlarına uyduğu görülmüştür. Bingöl coğrafi açıdan oldukça zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Bitki örtüsünün oluşumunda yılın büyük bir bölümünde güneşin fazla olmasının etkisi oldukça fazladır. Bölgede kışlar çok sert geçmektedir. Yazlarda kışların aksine oldukça sıcak geçmektedir. Bölgenin zengin bitki örtüsü arıcılık için çok uygundur. Üretilen balların kalitesi arıcılığın gelişimi ile artmaktadır. Ancak insanların kolay para kazanabilmek için balda sahtekârlıklar yapması bu kalitenin düşmesine sebep olmaktadır. Bunun engellenebilmesi için hem satıcıların hem de alıcıların konu hakkında bilinçlendirilmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

- Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA (2012).** Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 5, 618-625.
- Artık N (2004).** Bitkilerin bal potansiyeli ve balın bileşimi. *Teknik Arıcılık Dergisi*, 86, 21-24.
- Batu A, Küçük E, Çimen M (2013).** Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz Bölgeleri çiçek ballarının fizikokimyasal ve biyokimyasal değerlerinin belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(1), 52-62.

- Çetin K, Alkın E, Uçurum MHÖ (2011).** Piyasada satılan çiçek ballarının kalite kriterlerinin belirlenmesi. *Journal of Food and Feed Science-Technology*, 11, 49-56.
- Gül A (2008).** Türkiye’de Üretilen Balların Yapısal Özelliklerinin Gıda Güvenliği Bakımından Araştırılması. Doktora tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Hatay.
- Karadal F, Yıldırım Y (2012).** Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 9(3), 197-209.
- Kutlu M, Bengü AŞ (2015).** Gaziantep’te üretilen balların kalite kriterlerinin belirlenmesi, *Tr. Doğa ve Fen Derg.*, 4(1), 48-53.
- Ötleş S. (1995).** Bal ve Bal Teknolojisi (Kimyası ve Analizleri). Alaşehir Meslek Yüksekokulu Yayınları, Manisa.
- Paradkar MM, Irudayaraj J (2001).** Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chem.*, 76, 231-239.
- Sorkun K, Doğan N, Gümüş Y, Ergün K, Bulakeri N, Işık N (2002).** Türkiye’de üretilen doğal ve yapay balların ayırt edilmesinde fiziksel, kimyasal ve mikroskopik analizleri. *Mellifera*, 2(4), 13-21.
- Şahinler N, Gül A (2004).** Yayla ve ayçiçeği ballarının biyokimyasal analizi. IV. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 01-03 Eylül. Isparta.
- Şahinler N, Gül A (2007).** Isı Uygulaması ve Depolama Süresinin Çam Balının Kalitesi Üzerine Etkileri, 5. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-8 Eylül. Van.
- Şişek G, Şişek M, Arık M (2007).** Arıcının El Kitabı, Doğu Anadolu Kalkınma Programı Tarım ve Kırsal Kalkınma Bileşeni Kaynarca Köyü Çiftçi Grubu Arıcılığı Geliştirme Projesi, Varto-Muş.
- Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ (2002).** Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, 79, 373-379.
- Terrab A, González G, Diez MJ, Heredia FJ (2003).** Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 218(1), 88-95.
- Terrab A, Recamales AF, Hernanz D, Heredia FG (2004).** Characterization of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88, 537-542.
- TGK (2012).** Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2012/58) 27 Temmuz 2012 tarih ve 28366 sayılı Resmî Gazete.
- Thawley AR (1969).** The components of honey and their effects on its properties, A Review. *Bee World*, 50(2), 51-60.
- Tolon B, (1999).** Muğla ve Yöresi Çam Ballarının Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bil. Enst. İzmir.
- Vanhanen LP, Emmertz A, Savage GP (2011).** Mineral analysis of monofloral New Zealand honey. *Food Chem*, 128, 236-40.
- Velioglu S, Köse G (1983).** Ülkemizde üretilen ayçiçeği ballarının standarda (TS 3036) uygunluğu üzerinde bir araştırma. *J. Nutr. and Diet.*, 17, 285-293.
- Yılmaz H, Küfrevioğlu İ (2001).** Composition of honeys collected from eastern ant south-eastern anatolia and effect of storage on hydroxymethylfurfural content and diastase activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25, 347-349.
- Zappala M, Fallico B, Arena E, Verzare A (2005).** Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, 16(3), 273-277.



The Effect of Hormonal Treatment on Cell Viability in F98 Cell Line

Burcu Menekşe BALKAN¹  Görkem KISMALI²  Soner CENGİZ³  Tevhide SEL² 

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

² Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Ankara, Turkey

³ Kayseri University, Yeşilhisar Vocational Collage, Department of Animal Science, Kayseri, Turkey

Received: 16.09.2019

Accepted: 05.03.2020

ABSTRACT

The aim of the present study is to investigate the effects of three different steroid hormones; 17 β estradiol, Diethylstilbestrol and progesterone on cell viability in F98 glioblastoma cells. F98 glioblastoma cells were treated with different concentrations of Progesterone (10, 20, 50, 100 μ M), DES (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) and 17 β estradiol (0.01, 0.1, 1, 10 μ M)) for 24, 48 and 72 hours and MTT assay was applied to determine the cell viability. Progesterone inhibits glioblastoma cell growth in a dose and time dependent manner. Antiproliferative effect of 17 β estradiol was observed at low doses. Biphasic distribution was observed in decreasing cell viability in DES applications. These results suggest that Progesterone, 17 β estradiol and DES can inhibit the proliferation of glioblastoma cells. However, further study is necessary to identify the pathways involved.

Keywords: Diethylstilbestrol, Estrogen, Glioblastoma, Progesterone

ÖZ

Hormon Uygulamalarının F98 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 17 β östradiol, Diethylstilbestrol ve progesteron gibi steroid hormonların F98 glioblastoma hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. F98 glioblastoma hücrelerine farklı dozlarda Progesteron (10, 20, 50, 100 μ M), DES (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) ve 17 β estradiol (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanmış ve hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT hücre canlılık testi uygulanmıştır. Progesteron glioblastoma hücrelerinin büyümesini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe etmiştir. 17 β estradiol düşük dozlarda antiproliferatif etki göstermiştir. DES uygulamaları hücre canlılığı üzerinde iki yönlü etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Progesteron, 17 β estradiol ve DES'in glioblastoma hücrelerinde hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak bununla ilgili yolların belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Diethylstilbestrol, Östrojen, Glioblastoma, Progesteron

INTRODUCTION

Glioblastoma (GB) is a very common malignant primary brain tumor in adults. Though these tumors occur mostly in adults, no age is immune. It has a very poor prognosis. It was previously known as glioblastoma multiforme. Surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy is applied for therapeutic purpose (Virgil et al.2018).

The incidence of glioblastoma in general increases with age. Men have higher incidence than woman showing estrogen may have protective effects in women. In glioma development endogenous estrogens could have beneficial effects which explain that men are approximately 1.5–2 times more likely to develop proportional GB. In experimental studies, glioblastomas transplanted female animals showed a slower growth rate than in male animals (Kabat et al. 2010). Steroid hormones are biosynthesized in the mitochondria. Cholesterol derivatives are used for

the synthesis of steroid hormones (Miller and Bose2011) based on their biosynthesis, steroid hormones are classified as corticosteroids and sex steroids. Sex steroids (estrogen, progesterone, and androgen) are responsible for the development and maintenance of sexual characteristics in addition to general reproductive function. Besides their role in normal reproductive development, sex steroids may also play a role in the development and progression of several cancers (Marceau et al.2015). Estrogens are steroid hormones that exert important effects on the reproductive and gastrointestinal systems, mammary glands, skeletal and immune systems, and even the central nervous system (Tavares et al. 2016). Diethylstilbestrol (DES) is a synthetic form of the female hormone estrogen. DES also has been used in the treatment of prostate cancer to reduce testicular androgen production secondary to inhibition of LH released from the pituitary gland (Ali Shah 2015).

Progesterone participates in the regulation of several reproductive processes, including ovulation and sexual behavior. In synergism with estrogen, progesterone also influences neuronal excitability; learning and neoplastic proliferation of glial cells (Tavares et al. 2016). Steroid hormones play a key role in brain development and differentiation. Furthermore, ovarian steroid hormones are neuroprotective in a variety of neurologic disorders. These neuroprotective effects include improved myelination, decreased edema, inhibition of apoptosis and decreased inflammation (Tavares et al. 2016). Steroid hormones may also play a role in the development of brain tumors, because steroid hormone receptors are members of a superfamily of ligand-activated transcription factors that are potentially oncogenic (Kabat et al. 2010). In this study the effect of 17 β estradiol, Diethylstilbestrol (DES) and progesterone on glioblastoma cells were investigated.

MATERIALS and METHODS

F98 rat glioblastoma cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal bovine serum at 37°C in a 5% CO₂ environment. Progesterone, DES (a synthetic estrogen) and estrogen stocks were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and further diluted in culture medium. The final concentration of DMSO used in dilution was kept at <2.5 μ l/ml. Cells were exposed to different concentrations of Progesterone (10, 20, 50, 100 μ M), DES (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) and 17 β estradiol (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) for 24, 48 and 72 hours. Glioblastoma cell viability was assessed by MTT assay. The MTT assay is widely used to measure cell death/proliferation. In the reaction tetrazolium ring is cleavage to the pale yellow MTT into dark blue formazan crystals. Mitochondrial dehydrogenase enzyme in viable cells is responsible in this reaction. Formazan crystals impermeability to the cell membrane thus accumulate within the cells and SDS (100 μ l) is added to solubilize these crystals. The intensity of blue formazan solution is directly proportional to the number of surviving cells. Concentrations were determined by photometric analysis. Briefly, 10 μ l of MTT solution (5 mg/ml in phosphate buffered saline) was added per well and incubated at 37°C for 4 h until a purple

precipitate was visible. SDS (100 μ l) was added to solubilize the crystals and the absorbance was read at 570 nm.

Statistical Analysis

The experiment was replicated at least four times. The results were expressed as mean \pm SD. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's post hoc test to determine significant differences in all parameters among all groups. SPSS/PC computer program (IBM SPSS Statistics version 22.0) was used for statistical tests and differences with values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Cell viability of rat F98 glioblastoma cells was measured at 24, 48 and 72 h after exposed to different concentrations of Progesterone (10, 20, 50, 100 μ M), DES (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) and 17 β estradiol (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) (Table 1, 2, 3). After 24-hour exposure, decreased cell viability in all doses of DES applications were observed. Decrease in all groups compare to control group was significant ($p < 0,05$). After 48 hours cell viability in 20 μ M and 50 μ M DES applied cell was the same level compare to control cells. But in other doses cell viability decreased compared to control group ($p < 0,05$). After 72-hour exposure there was a reduction in cell viability in all groups compare to control group ($p < 0,05$). Most distinctive reduction in cell viability/proliferation of F98 cells in 72h application was in 100 μ M DES applied cells (Figure 1). These differential effects could be due to the activation of distinct signaling mechanisms by DES, depending on its concentration and time. DES, a synthetic form of the female hormone estrogen, had remarkable effect on cell viability in all doses after 24-hour exposure (Figure 1). 17 β estradiol estrogens showed antiproliferative effect on cell viability. Antiproliferative effect of 17 β estradiol was observed at all doses (0.01-1 μ M) ($p < 0,05$) after 24 hours. There were no differences in cell viability at 10 μ g 17 β estradiol concentrations compare to control (Figure 2). Cell viability in rat F98 glioblastoma cells at 48 and 72 hours decreased in all doses of 17 β estradiol compare to control ($p < 0,05$).

Table 1. The mean (\pm SD) cell viability (%) of F98 cells, 24h, 48h and, 72h exposure of different DES concentrations (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ M)

| Groups | 24 h | n | 48 h | n | 72 h | n |
|-------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|---|---------------------------------|---|
| | % cell viability (\pm SD) | | % cell viability (\pm SD) | | % cell viability (\pm SD) | |
| Control | 99.83 \pm 5.46 ^a | 6 | 100.00 \pm 13.83 ^a | 7 | 100.13 \pm 11.18 ^a | 8 |
| DES (2.5 μ M) | 50.67 \pm 7.64 ^b | 6 | 79.86 \pm 13.11 ^b | 7 | 67.00 \pm 4.05 ^c | 6 |
| DES (5 μ M) | 40.45 \pm 6.37 ^{bc} | 6 | 78.00 \pm 13.25 ^b | 7 | 64.40 \pm 5.64 ^c | 5 |
| DES (10 μ M) | 37.23 \pm 4.67 ^{bc} | 6 | 73.14 \pm 5.43 ^b | 7 | 66.40 \pm 11.01 ^c | 5 |
| DES (20 μ M) | 46.23 \pm 6.88 ^{bc} | 6 | 99.25 \pm 7.54 ^a | 4 | 84.40 \pm 4.56 ^b | 5 |
| DES (50 μ M) | 42.05 \pm 7.18 ^c | 6 | 100.88 \pm 12.91 ^a | 8 | 77,88 \pm 6,62 ^b | 8 |
| DES (100 μ M) | 46.27 \pm 13.06 ^c | 6 | 54.33 \pm 28.36 ^c | 6 | 13,17 \pm 5,74 ^d | 6 |
| P value | <0,05 | | <0,05 | | <0,05 | |

^{a, b} Different superscripts within the same column demonstrate significant differences

Table 2. The mean (± SD) cell viability (%) of F98 cells 24h, 48h and, 72h exposure of different progesterone concentrations (10, 20, 50, 100 µM)

| Groups | 24 h | n | 48 h | n | 72 h | n |
|-----------------------|----------------------------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|---|
| | % cell viability (± SD) | | % cell viability (± SD) | | % cell viability (± SD) | |
| Control | 80.65 ± 40.40 ^a | 6 | 79.00 ± 3.91 ^a | 6 | 100.33 ± 14.14 ^a | 6 |
| Progesterone (10 µM) | 76.57 ± 12.38 ^a | 6 | 64.83 ± 21.74 ^{ab} | 6 | 60.17 ± 25.64 ^{bc} | 6 |
| Progesterone (20 µM) | 70.47 ± 36.10 ^a | 6 | 50.50 ± 31.13 ^{ab} | 6 | 54.60 ± 26.65 ^{bc} | 6 |
| Progesterone (50 µM) | 64.00 ± 2.86 ^a | 6 | 70.17 ± 3.49 ^{ab} | 6 | 69.83 ± 3.60 ^{ab} | 6 |
| Progesterone (100 µM) | 20.85 ± 11.02 ^b | 6 | 36.80 ± 18.03 ^b | 5 | 35.33 ± 16.53 ^c | 6 |
| P value | <0,05 | | <0,05 | | <0,05 | |

^{a,b} Different superscripts within the same column demonstrate significant differences

Table 3. The mean (± SD) cell viability (%) of F98 cells 24h, 48h and, 72h exposure of different 17 β estradiol concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 µM)

| Groups | 24 h | n | 48 h | n | 72 h | n |
|-------------------------|----------------------------|---|-----------------------------|---|----------------------------|---|
| | % cell viability (± SD) | | % cell viability (± SD) | | % cell viability (± SD) | |
| Control | 99.83 ± 5.46 ^a | 6 | 100.00 ± 13.83 ^a | 7 | 100.17 ± 5.35 ^a | 6 |
| 17β estradiol (0.01 µM) | 60.38 ± 7.41 ^b | 8 | 89.50 ± 26.56 ^{ab} | 4 | 68.71 ± 12.98 ^b | 7 |
| 17β estradiol (0.1 µM) | 71.00 ± 24.51 ^b | 8 | 74.17 ± 10.91 ^b | 6 | 71.67 ± 6.35 ^b | 6 |
| 17β estradiol (1 µM) | 61.00 ± 17.47 ^b | 7 | 72.71 ± 6.53 ^b | 7 | 70.33 ± 15.25 ^b | 6 |
| 17β estradiol (10 µM) | 93.38 ± 17.00 ^a | 8 | 78.25 ± 5.85 ^b | 4 | 75.00 ± 6.44 ^b | 5 |
| P value | <0,05 | | <0,05 | | <0,05 | |

^{a,b} Different superscripts within the same column demonstrate significant differences

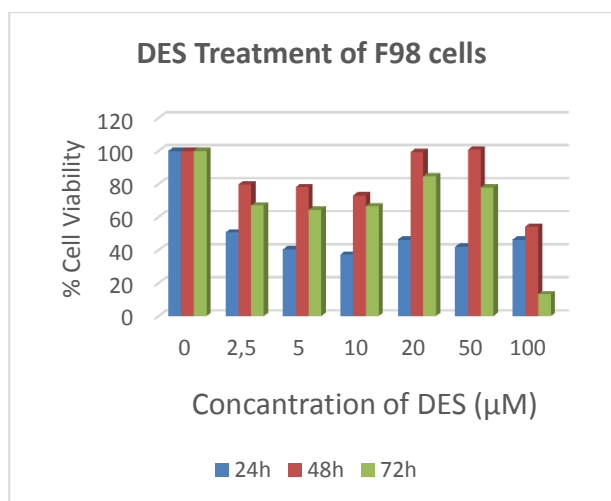


Figure 1. Cell viability assay. Graph of MTT assay showing the rate of viability of F98 cells 24h, 48h and, 72h exposure of different DES concentrations (2.5, 5, 10, 20, 50, 100 µM) along with controls.

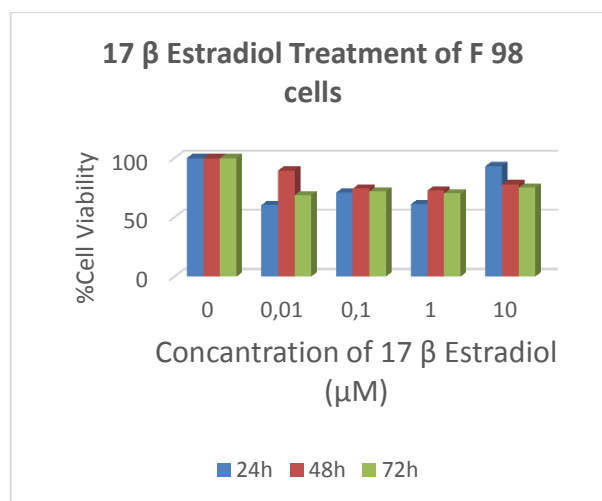


Figure 2. Cell viability assay. Graph of MTT assay showing the rate of viability of F98 cells 24h, 48h and, 72h exposure of different 17 β estradiol concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 µM) along with controls.

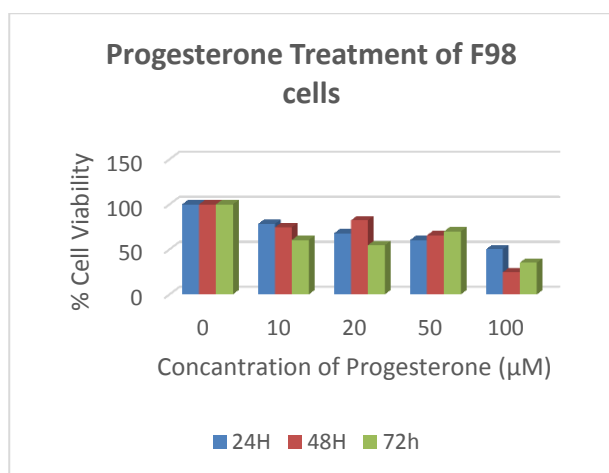


Figure 3. Cell viability assay. Graph of MTT assay showing the rate of viability of F98 cells 24h, 48h and, 72h exposure of different progesterone concentrations (10, 20, 50, 100 µM) along with controls.

DISCUSSION

In various functions related to the brain, including central and peripheral nervous system development, neurotransmitter systems regulation, and myelination, steroid hormones have a role in regulation. In addition to these function properties, they have also role in cognition, emotion, mood, sexual behavior and social behavior (Rossetti et al. 2016). Cholesterol or steroidal precursors imported from both neurons and glia are used de novo synthesis of steroid hormones. Locally synthesized hormones, neurosteroids, binds their receptors to regulate several central nervous system functions. They also play a role in neurodegenerative disease and ageing mechanism (Rossetti et al. 2016). In the brain and other tissues, depending on the estrogen receptors (ERs) concentration and the expression estrogen may induce cell growth or cell death. According to Altioek et al. estradiol induces apoptosis and suppresses cell growth in a concentration and time-dependent manner in C6 glioma and T98G glioblastoma cells. Since C6 glioma and T98G glioblastoma cells express ERs, estradiol may have effects glioblastoma cells because it regulates the ER-mediated transcription of genes involved in cell survival and death and activates of intracellular signaling pathways on neurons and glial cells (Altioek et al. 2011). According to Ho et al., the incidence of gliomas has increased in the last 21 years (Ho et al. 2014). Estrogens may influence the development and control of brain tumor growth by interacting with their receptors or activating potentially oncogenic mediators. Estrogens seem to have a protective effect on the development of gliomas because they occur more commonly in men than in women. In women, the incidence of gliomas increases during the postmenopausal period, when estrogen levels are low (Dueñas Jiménez et al. 2014; Kabat et al. 2010; Patel et al. 2012). In previous study, it was indicated that estradiol suppresses cell growth in C6 glioma and T98G glioblastoma cells (Altioek et al. 2011). In our study, similar result obtained in F98 cell line. But comparing the effect of diethylstilbestrol (DES), 17 β estradiol did not have remarkable effect on cell viability. This effect may be due to the fact that DES is estimated to be five times more potent than the naturally occurring estrogen, estradiol (Korach et al. 1978; IARC 2012). Hormonally inactive compounds (such as β-di-estrol) or compounds that retain estrogenic activity (like DES-

epoxide or quinone metabolites) are produced following to oral absorption and metabolism of DES (Korach et al. 1978; IARC 2012). *In vitro* studies indicate that progesterone promotes cell proliferation in astrocytomas, as well as the expression of genes that are important for tumor growth and dissemination, for example vascular endothelial growth factor (Ding et al. 2000). However, there are several studies in the literature confirming that progesterone has anti-proliferative and apoptotic effects on ovarian, breast, endometrial and colon tumors as well as gliomas (Atif et al. 2015; Cabrera-Muñoz et al. 2011; Tang et al. 2006). According to Atif et al., high doses of progesterone inhibit the growth of glioblastoma multiforme, both in vitro and in animal experiments. This effect was shown to mainly involve the inhibition of cellular proliferation and angiogenesis and the induction of apoptosis. They also found that progesterone improves Temozolomide (TMZ)'s (an anticancer agent) efficacy in glioblastoma cells and reducing its adverse effects it protects primary healthy cells (Atif et al. 2015).

CONCLUSION

These findings suggest those hormones such as progesterone, diethylstilbestrol (DES), and 17 β estradiol can reduce glioblastoma cells proliferation. There is need for further studies to clarify their way of action.

REFERENCES

- Ali Shah SI (2015). Emerging potential of parenteral estrogen as androgen deprivation therapy for prostate cancer. *South Asian J Cancer*, 4(2), 95–97.
- Altioek N, Ersoz M, Koyuturk M (2011). Estradiol induces JNK-dependent apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol Lett*, 2 (6), 1261–1285.
- Atif F, Patel NR, Yousuf S, Stein DG (2015). The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE*, 10(6): e0131441.
- Cabrera-Muñoz E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I (2011). Role of progesterone in human astrocytoma growth. *Curr Top Med Chem*, 11(13), 1663–7.
- Ding H, Wu X, Roncari L et al. (2000). Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int J Cancer*, 88, 584–592.
- Dueñas Jiménez JM, Candanedo Arellano A, Santerre A et al. (2014). Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J Neurooncol*, 119 (2), 275–84.
- Ho VK, Reijneveld JC, Enting RH et al. (2014). Changing incidence and improved survival of gliomas. *Eur J Cancer*, 50(13), 2309–18.
- IARC (2012). International Agency for Research on Cancer. Pharmaceuticals. Diethylstilbestrol. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 100A, 175–218.
- Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE (2010). Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(10), 2421–7.
- Korach KS, Metzler M, McLachlan JA (1978). Estrogenic activity in vivo and in vitro of some diethylstilbestrol metabolites and analogs. *Proc Natl Acad Sci*, 75, 468–71.
- Marceau K, Ruttle PL, Shirtcliff EA, Essex MJ, Susman EJ (2015). Developmental and contextual considerations for adrenal and gonadal hormone functioning during adolescence: Implications for adolescent mental health. *Dev. Psychobiol*, 57, 742–768.
- Miller WL, Bose HS (2011). Early steps in steroidogenesis: Intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res*, 52, 2111–2135.
- Patel S, Dibiase S, Meisenberg B et al. (2012). Phase I clinical trial assessing temozolomide and tamoxifen with concomitant radiotherapy for treatment of high-grade glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 82(2), 739–42.
- Rossetti MF, Cambiasso MJ, Holschbach MA, Cabrera R (2016). Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *J Neuroendocrinol*, 28 (7), 1–11.
- Tang P, Roldan G, Brasher PM et al (2006). A phase II study of carboplatin and chronic high-dose tamoxifen in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*, 78 (3), 311–6.
- Tavares CB, Gomes-Braga FC, Costa-Silva DR et al. (2016). Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: a literature review. *Clinics*, 71 (8), 481–486.
- Schijns V, Pretto C, Strik AM et al. (2018). Therapeutic Immunization against Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2540.



The Determination of *Listeria monocytogenes* in Foods with Optical Biosensors

Özmen BİBEROĞLU¹

Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Erzurum, Türkiye

Received: 07.11.2019

Accepted: 03.03.2020

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a food-borne intracellular pathogen that is resistant to adverse conditions of food processing and is a causative agent of high mortality listeriosis disease. Analysis of large food lots is limited by culture methods. Nowadays, although the conventional culture methods have been adopted as the gold standard method, they can be insufficient to control food parties that reach very large quantities. Biosensors with on-site detection potential and their characterizing with high accuracy and precision offers many opportunities for real-time estimation of industrial contamination. As the most promising technique for rapid detection of *L.monocytogenes*, ones based on surface plasmon resonance (SPR) and fiber optic biosensors (FOBs) where direct or indirect detections can be made by detecting the interaction of the biomarker element with the optical field without marking or labeling, have come to the fore. SPR and FOBs can be detected directly in the range of 10^2 - 10^6 cfu/ml and $\leq 10^1$ - 10^3 cfu/ml, respectively.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Biosensor, Surface plasmon resonance, Fiber optic

ÖZ

Gıdalardan *Listeria monocytogenes*'in Optik Biyosensörlerle Belirlenmesi

Listeria monocytogenes gıda kaynaklı intrasellüler patojen olarak gıda işlemenin olumsuz koşullarına dayanıklı ve yüksek mortaliteli listeriaz hastalığının etkenidir. Büyük gıda partilerinin kültür yöntemleri ile analizi sınırlıdır. Günümüzde, geleneksel kültür yöntemleri altın standart yöntem olarak benimsenmesine karşın, çok büyük miktarlara ulaşan gıda partilerini kontrol etmede yetersiz olabilirler. Biyosensörlerin yerinde tespit potansiyeli ile yüksek doğruluk ve hassasiyetle karakterize edilmeleri, endüstriyel kontaminasyonları gerçek zamanlı tahminde birçok fırsat sunmaktadır. *Listeria monocytogenes*, hızlı tespit için en umut verici teknik olarak işaretleme veya etiketleme yapılmadan optiksel alanla biyotanyıcı eleman etkileşiminin optik sinyallerle belirlenerek doğrudan veya endirekt tespitlerin yapılabilirdiği yüzey plazmon rezonans (SPR) ve fiber optik biyosensör (FOB) esaslı olanları ön plana çıkmıştır. SPR ve FO biyosensörleri ile sırasıyla 10^2 - 10^6 kob/ml ve $\leq 10^1$ - 10^3 kob/ml aralıklarında doğrudan tespit yapılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, Biyosensör, Yüzey plazmon rezonans, Fiber optik

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is defined as a food-borne pathogen and as causative agent of listeriosis disease with low morbidity and high mortality. The pathogen can survive under most of adverse conditions of food processing stages and cause contamination. In many countries, the restrictions are imposed to food products, especially the number of ready-to-use products.

Nowadays, although the conventional culture methods have been adopted as the gold standard method, they can be insufficient to control food parties that reach very large quantities. Precise, fast and reliable methods come to the fore. There are many quick detection methods based on different principles.

In addition to providing rapidly and directly to obtain the results, biosensors also have the potential to provide the

on-site detection of the, which allows rapid monitoring of important or critical control points in food processing. The high accuracy and sensitivity of biosensing techniques have made it the key to increasing biosensor applications in food quality control.

It is possible to classify biosensors used in foodborne pathogen and toxin detection as optical, electrochemical and piezoelectric biosensors on the basis of transduction mechanisms. Most of the biosensors used in the food industry and research laboratories are optical ones. In this review, we will investigate the use and the advantage of optically based biosensors in the detection of *L.monocytogenes* in foods.

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes was firstly isolated from a human with meningitis in France in 1921, then from other mammalian and non-mammalian species. It was not identified as the

causative agent of food-borne outbreaks in humans until the 1980s (Walland et al. 2015).

L. monocytogenes, which is common in nature, can grow at refrigerator temperature, may contaminate many foods during production, packaging, transportation and storage, is a food pathogen, becoming an important public health subject with consumption such as contaminated foods because of causing severe and nonenteric features of listeriosis in humans as intracellular pathogen (Mor-Mur and Yuste 2010; Sireli and Erol 1999). The bacterium is Gram positive, facultative anaerobe, oxidase negative, catalase positive, small moving shaped-rods (0.4-0.5×1-2 µm) and non-spore. It is movable at 22-30 °C and is immobilized at 37 °C due to its inability to develop flagellum. In addition it can develop in adverse environmental conditions such as high salt concentration, low temperature (development at 40.4 °C), high temperature (development at maximum 45 °C), a wide pH range (4.4-9.4) and low water activity (as like 0.9). The pathogen is completely inactivated at 75°C (Chlebicz and Slizewska 2018).

L. monocytogenes is characterized by high genetic differences. In other words, it contains numerous strains. There are reports of differences between strains related to virulence and contamination (Walland et al. 2015). The serotyping developed for subtype differentiation revealed that the majority of human and animal infections were caused by only three different serotypes (1/2a, 1/2b and 4b). These serotypes are also the most common serotypes isolated from food (Walland et al. 2015).

The presentation of the intracellular pathogenicity of *L. monocytogenes* in host organisms means the infection. The pathogen has the ability to penetrate not only the intestinal cells, but also the spleen, liver, brain, heart and placenta. It settles in the vacuole after cell invasion. The pathogen separated from this location begins proliferation, and is activated in other cells by the actin-based motility mechanism without stimulating the immune response of the host organism. The pathogenicity is due to a number of virulence factors such as the adhesive protein (LAP), internalin, listeriolysin O, phospholipase C, actin polymerization protein (ActA), which is the superficial protein, and OrfX protein (Chlebicz and Slizewska 2018).

1. Biosensors

The detection of *L. monocytogenes* is primarily important for the food industry, water and environmental quality control and public health. In technologies where biosensors are used, biological receptors are physically or chemically coupled to converter called as the transducers, thereby yielding unique tools with great potential for rapid, online and real-time diagnosis of biological agents. The basic model of its use is the determination of pathogens from food and environmental sources (Soni et al. 2018).

Biosensors are defined as analytical devices that combine the recognition molecule biologically derived such as antibody, phage, aptamer, single-stranded DNA with a suitable physicochemical transduction mechanism (Iqbal et al. 2000). In other words, these devices from consist of a biomolecule (eg, tissue, microorganism, cell receptors, organelles, antibodies, nucleic acids, enzymes, etc.), that interacts with the targeted analyte in the analyzed sample and is indicated by signals generated the presence of the analyte, a biologically derived molecule (eg, engineered proteins, recombinant antibodies, aptamers, etc.) or biomimic molecule (eg combinatorial receptors, synthetic catalysts, imprinted polymers (Soni et al. 2018).

Biosensors generate an electronic or optical signal that can be measured and recorded in proportion to the specific biological interaction between the analyte and the recognition molecule. With these signals, a wide variety of targets can be detected from small molecular weight proteins to pathogens. If the sensitivity and selectivity of the biosensor is very high, the faster results can be achieved as an alternative to the culture method in practical field applications. In comparison with traditional analysis methods, the biosensor is a device capable of detecting pathogenic antigens and does not require highly trained personnel (Turner 2000).

Biosensors are desired to have many features such as accurate, close to real time, sensitive, specific, reproducible, robust and easy to use. In order to be acceptable practical devices, the number of false positive and false negative results should be very low and zero if possible. Since the most important characteristics of the traditional culture methods are the analysis period, this period should be less than one hour. Sensitive sensors are a must for the food industry. Any false negative results can result in high cost collection and loss of community trust. On the other hand, the false positive result will lead to cost increases that are reflected to the producer and ultimately to the consumer. It is desirable that responses from biosensors be quantitative and reproducible. It must be mechanically and biochemically resistant and robust. Ultimately, the biosensors to be used in the analysis should carry the easiness that does not require the need for highly trained and qualified personnel.

To date, the various biosensors have been developed for the detection of *L. monocytogenes*. Recently, the other many biosensor devices that use piezoelectric, thermometric, micromechanical, cell based and electrochemical transduction elements, and especially optical ones have been extensively investigated for rapid detection (Iqbal et al. 2000; Soni et al. 2018).

In this study 200 food handlers from different plants were interviewed. Questionnaires were responded individually, in the presence of the researcher, 30 minutes time required for completion.

2. Optical biosensors

Optical biosensors (OBSs) are analytical devices capable of detecting interaction the biorecognition between the optical field. Thanks to the transducers used, it is possible to detect bacteria directly without marking or labeling. They can even detect small changes in refractive index and thickness resulting from binding of cells to receptors fixed to the transducer surface.

Optical sensor signals are multi-purpose signals because it is possible to use in the pathogen detection directly or by increasing their intensity with other techniques. OBSs are subcategorized according to their reflection, refraction, resonance, dispersion, infrared absorption, Raman scattering, chemiluminescence, fluorescence. Unlike the others, in fluorescent sensors, a fluorescent compound conjugated to the antibody assists in the detection of the pathogen (Arora et al. 2011). The most commonly used marker routinely is fluorescein isothiocyanate. It is reported that some lanthanides can also be used for the same purpose (Arora et al. 2011).

Currently, fiber optic biosensors (FOBs) are developed for the detection *Listeria* spp. and other pathogens as *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., botulinum and staphylococcal enterotoxin. (Arora et al. 2011). It has been reported that OBSs are commonly used in surface plasmon resonance

(SPR) and evanescent FOB techniques. (Lee et al. 1997; Turner 2000).

2.1. Surface plasmon resonance based biosensors

Surface plasmon resonance (SPR) biosensor technology is one of the most promising methods for rapid pathogen identification (Joung et al. 2007). There is an increase in the use of SPR-based OBSs that are close to real-time and allow detection without labeling. With these sensors, pathogen detection in the food chain can be made directly and indirectly. (Bergwerff and Van Knapen 2006). Monoclonal or polyclonal antibodies identified to the target pathogen facilitated the direct detection. In pathogen isolation from food, antibodies are immobilized to the solid phase of the sensor. Antibodies can be used in inhibition-like analysis. Incubation of antibodies with the target pathogen prior to detection of unbound antibodies is envisaged. The free antibodies are screened on the surface of an SPR sensor coated with either purified antigens or Fc or Fab binding antibodies. Diagnosis can be made by SPR analysis on the polymerase chain reaction products of toxin genes of pathogens. On the other hand, the possibility of using various metabolic products as biomarkers has provided the possibility of indirect detection with SPR biosensors developed (Bergwerff and Van Knapen 2006).

In the SPR technique, when the target analyte binds to the ligand immobilized to the transducer surface, the OBS detects signals where are produced near the top surface of the sensor, which result from small changes of several hundred nanometers in the refractive index (Joung et al. 2007; Rich and Myszka 2001). SPR biosensors have been developed at wide ranges for the direct detection of *L. monocytogenes* and other food pathogens. The detection range was reduced to 10^2 - 10^7 bacteria/ml with developed sensors at very low levels depending on the type of detection (Joung et al. 2007).

SPR is defined as an optical event in which resonance is generated by surface plasmon waves, known as excitation and increase in density of electrons by polarized light. The structure of an SPR sensor is formed by a generally gold metal covering electrically insulating material such as quartz. The wave area, which is known as the evanescent wave (EW) field (EWF) and whose amplitude decreases, is formed between the metal and the insulating material and spreads to the external environment. Since EW are exponentially reduced from the surface, surface interactions can be detected by SPR technique (Dover et al. 2009; Shankaran et al. 2007). When SPR occurs, there is a significant reduction in reflected light intensity. The wavelength or angle at which resonance occurs is dependent on the refractive index (RI) of the other insulating layer adjacent the metal layer. Resonance deviations can be determined by monitoring changes in reflected angle, wavelength or reflection intensity. The RI of interface can be calculated from the resonance angle or wavelength (Tubb et al. 1997).

The Kretschmann figuration, which consists of a metal layer placed on the base of the quartz prism, is popular for the usage in surface plasmon resonance devices, and the devices produced on the basis of this figuration are commercially available. Koubov et al. (2001) were able to detect *L. monocytogenes* at 10^6 cfu/ml by SPR technique based on the placement of an optical sensor in the classical Kretschmann prism figuration. Leonard et al. (2004), in the indirect detection of *L. monocytogenes* in buffered solution by SPR technique using BIA3000 detector, firstly incubated *L. monocytogenes* with polyclonal rabbit

antibodies and then removed dead bacteria and unbound antibodies from the solution medium by centrifugation and determined the amount of antibody, could not form antigen-antibody complex from the supernatant, by biosensor they developed. They reported that the pathogen had been detected as 10^5 cfu/ml.

In the quantitative and simultaneous detection study of four different pathogen bacteria with an eight-channel optical SPR sensor, it reported that the detection at the level of approximately 3.5×10^3 cfu/ml may be obtained by complexing biotinylated rabbit polyclonal antibodies immobilized on the sensor surface with *L. monocytogenes* which prepared in phosphate buffered saline (PBS) at a concentration of 5×10^5 cfu/ml (Taylor et al. 2006). Nanduri et al. (2007) detected the pathogen at 2×10^6 cfu/ml by applying the biosensor, which they developed by using the single-chain scFv antibody expressed from the surface of Lm P4: A8 coded phage specific ActA, to the SPR technique.

Poltronieri et al. (2009) detected *L. monocytogenes* at 10^2 - 10^6 cfu/ml in the SPR technique by using an immunosensor consisting of secondary antibodies fixed to the gold electrode. With this study, it was concluded that the use of SPR sensor in water, vegetable and environmental samples would be appropriate. In a study using phage endolysins, firstly affinity levels of endolysins were determined by using SPR technique in pico and nanomolar ratios, then endolysins were labeled with fluorescent marker dyes of various colors. Thereafter, multiplex determinations could be made both species and serotype levels with fluorescence microscope in 15 minutes after they were incubated with milk and cheese samples with inoculated *Listeria* spp. (Schmelcher et al. 2010).

In a study which a gold-plated microchip biosensor was designed for the detection of *L. monocytogenes* and different pathogens by diffraction-network coupled surface plasmon resonance imaging, known as combining the parallel light with surface plasmons, two different monoclonal anti-*Listeria* antibodies and one rabbit polyclonal anti-*Listeria* antibody and the negative control antibodies were immobilized on microchips at equivalent concentrations and analyzed with a sample containing *L. monocytogenes* heat-killed at a concentration of 1.65×10^9 cfu/ml in PBS with 0.5% Tween 20. It has been found LZf monoclonal antibody caused deviation with a much larger resonance angle than LZH1 polyclonal antibody and reported that the slight differences in the affinity for *L. monocytogenes* of the antibodies may be due to the procedure used to kill the pathogen (Marusov et al. 2012). Together this study, the single-use chips were opened and compact microarray sensoric chips were equipped with antibodies or other specific recognition molecules for multiplex analyte detection. With these chips, the listerias can be detected at a detection limit of 10^6 cfu/ml compared to other pathogens.

In a study conducted with resonance mirror SPR biosensor (IASys) produced by immobilization of MAb-C11E9 monoclonal antibody, which used in immunoseparation and immunosensor applications, to carboxylate cuvette, live *L. monocytogenes* V7 bacteria were detected in high concentrations such as 1×10^8 , 2.5×10^8 and 5×10^8 cfu/ml (Lathrop et al. 2003). In this study, the lack of signal from the IASys sensor was related to the sensing of EWF at 200-300 nm from the surface. However, in the same study, it was reported that raw surface proteins extracted from *L. monocytogenes* could receive signals. In a study using anti-InlA monoclonal antibodies with code mAb2B3 prepared

for the serotype of *L. monocytogenes* 1/2a on a platform based on SPR and ELISA, it was reported that virulent *L. monocytogenes* could be detected at concentrations of 10^7 cfu/ml (Hearty et al. 2006).

In a study aimed at the rapid and simultaneous detection of *L. monocytogenes* and three food pathogens with surface plasmon resonance (SPR) biosensors, by analyzing the homogenates prepared from sonication of suspensions of different concentrations of pathogens using with SPR biosensors and sensor chips produced by polyclonal antibodies specific to the pathogens, it was concluded that the working with the precipitates obtained from the centrifugation of homogenates increased the detection sensitivity and reported that the lower detection limit of *L. monocytogenes* may be 0.7×10^7 cfu/ml if the detection from precipitates with a multichannel SPR biosensor is carried out, even if non-target pathogens are at concentrations of 10^5 - 10^8 cfu/ml (Zhang et al. 2014).

2.2. Fiber optic based biosensors

Fiber optic-based biosensors (FOBs) are produced from tapered silica or polystyrene microfiber material for better transmission and reception of light signals, and react responsively to EWF changes resulting from RI exchange when analyte is bound (Arora et al. 2011; Sharma and Mutharasan 2013; Soni et al. 2018).

FOBs are defined as a sandwich immunoassay based on collecting target pathogens on a polystyrene guide wave with a pathogen-specific fluorophore-tagged biotransmission molecule including antibodies, aptamers and receptor proteins. FOBs can be used directly in pre-enriched/selectively enriched samples in culture media and results can be obtained within 8-24 hours depending on pathogen type and assay sensitivity. *L. monocytogenes* and many other food pathogens can be used successfully for identification. The pathogen counts can also be done since the signal intensity is proportional to the concentration (Abdelhaseib et al. 2016).

If the sensing surface of fiber is prepared with recognition biomolecules, the target analytes such as pathogen or toxin bind to this fluorescent labeled surface. When binding occurs, they are excited by laser wave (635 nm). The fluorescent signals being by stimulating are detectable by a fluorescent detector. If the biomolecule is antibody, binding can be achieved by avidin-biotin interaction or by simple adsorption. Such binding can be used as a sandwich immunoassay system (Arora et al. 2011; Sharma and Mutharasan 2013; Soni et al. 2018).

When the target analyte is binding to the optical fiber, the changes in optical yield are observed, surface RI modulation occurs as an indicator of EWF change. The fibers operate with minimal loss of light due to the total internal reflection of the transmitted or passed light in the fiber core. The emitted light has two components, which are the core guiding field and exponentially decreasing EWF in metal coating. In EWF sensing, since interaction with the environment is important, this can only be achieved by thinning the metal coating. Because the EWF has a size of up to several hundred nanometers, the analyte binding leads to extremely small RI change on the surface, resulting in significant changes in optical transmission (Sharma and Mutharasan 2013). The light emission in fiber is explained by wave theory, and the properties of light in the core are determined by the number of modes (N). In multimode fiber, there is a one-to-one relationship between modes and angle of incidence. The number of modes is directly related to a unitless

parameter known as the V value as seen in formula I (Buck 1995).

In single-mode fiber with uniform diameter, light is emitted in single mode. However, if the V value changes throughout the fiber due to changes in shape or local RI of the fiber, the single mode fiber may exhibit a multimode fiber property. The matching can be done in modes, in which case the transmission takes place in multiple mode, thereby increasing the evanescence ratio of the transmission. The increase in EWF increases the amount of light that interacts with the surface immobilized molecules, thus achieving the purpose of the analysis for detection.

$$V_{core} = (2\pi/\lambda)\rho[n_{core}^2 - n_{cover}^2]^{1/2} \quad (I)$$

(In the formula, V_{core} : The number of modes ρ : The central radius λ : The wavelength of the light n_{core} and n_{cover} : the core and cover of refractive index values, respectively)

Although various methods have been developed to increase EWF in FOBs, the most useful one is conical geometric fibers. There are their some advantages such as low cost, small size, multi-channel and remote sensing (Abdelhaseib et al. 2016).

There are two types of conical fiber optic biosensor (CFOB) geometry useful in today's biosensings. These are tapered ends and continuous tapered fibers (Sharma and Mutharasan 2013). Tapered fibers consist of optical fibers that gradually decrease in diameter to become a micron-size tip. The tapered tip is used as a sensing element. This taper of the tip serves as a conductor for collecting the reactive light, both for receiving light from the light source and for measuring. At the present time, various conical geometry tips such as stepped, conical and combined conical are being investigated extensively for biochemical and clinical applications. The step-shaped tips are produced by dipping into hydrofluoric acid, resulting in a rapid reduction in diameter, resulting in a chemically etched fiber tip. This geometry was found to be of low sensitivity due to the weak V number match leading to a large power loss (Anderson et al. 1993; Kharat et al. 2006). In contrast, the diameter of the elongated tip, while retaining its conical shape, is continuously reduced in the tapered ends and eventually becomes a tip with a nanometer sized radius. Thus, the advanced optical design is obtained. The diameter of the combined tapered ends is reduced non-linearly, which results in a continuous match of the V number, resulting in very low signal loss (Anderson et al. 1993). The biorecognizing molecule is fixed to the conical surface of this region having the smallest diameter, where the strength of EWF is very high. The continuous biconic fibers consist of three regions, which are convergence region or the convex region, the region of fixed diameter called the waist and the region of increasing diameter (Rijal et al. 2005). Because of the waist region in smaller diameter, the EWF is at the maximum level and this region is used for detections. Here, absorption, scattering, fluorescence and resonance changes may occur. Absorption, fluorescence and transmitted light resulting from fluorescence are collected in the region of increasing diameter for the purposes of different diagnostic methods. The two main optical sensing mechanisms of CFOBs are associated with the severity and absorption of light. The sensors based on light severity measurement are ones that have been researched and used today (Sheeba et al. 2005). When the light is passed through a tapered fiber, provided that the analytes attached to the conical surface produce absorption at the wavelength of the transmitted light, the EWF interaction

with the analytes results in a decrease the transmitted light intensity and the magnitude of the decrease is proportional to the analyte concentration. Therefore, the thinning-tapered fibers can be used only by selecting the wavelength of light according to the absorption spectra of the analyte. The magnitude changes in the EWF are determined by measuring the power output changes in a uniform unclad fiber or CFOBs. Factors such as bending, radius, length and taper ratio affect the sensitivity of the CFOBs because the geometric parameters are effective in the performance of density-based sensors. The bending of a tapered fiber increases the EWF ratio in the detection region, thus increasing the measurement accuracy (Díaz-Herrera et al. 2003; Guo and Albin 2003; Mackenzie and Payne 1990; Mignani et al. 1998; Sheeba et al. 2005; Villatoro et al. 2005). Similarly, the smaller radius provides a higher sensibility (Díaz-Herrera et al. 2003). The longer fibers are used to increase the penetration depth at shorter wavelengths (Chen 2004). On the other hand, the tapered region at the bottom also enables the lower row modes to be efficiently matched to the higher row modes in the fiber cover (Guo and Albin 2003).

A light model is to define the relationship of penetration depth with refractive index, conical ratio, length, angle of incidence, numerical aperture and position on conical axis. In this model, the optimal taper ratio (taper diameter/fiber diameter) is required for sensitive response. When the taper ratio is large, EWF can be omitted, but this leads to a decrease in sensor accuracy. Similarly, if the conical ratio is small, the mode propagates so high that it tends to be a free-space wave, causing low signals to be sent to the detector, resulting in a decrease in sensor sensitivity (Ahmad and Hench 2005; Bures and Ghosh 1999). Due to the above mentioned reasons, the choice of the optimum conical ratio takes into account the optical properties of the medium or solution in which the sample is analyzed and the wavelength used.

Currently, FOBs with various antibodies are being developed for the detection of *L. monocytogenes*, other food pathogens, botulinum toxin and staphylococcal enterotoxins. Sample analysis in buffer solutions can be easily performed. If non-target molecules are present in the sample matrix, their non-specific binding to recognition molecules may interfere with detection (Arora et al. 2011).

In a study in which *L. monocytogenes* was determined to be 4.3×10^3 cfu/ml in medium culture by the combination of FOBs and antibody-based sandwich fluorescence technique, it was found that the sensor was specific to *L. monocytogenes* and is reported that there is no decrease in the received signal strength in the presence of various *Listeria* species and microorganisms in the medium (Aguilar and Fritsch 2003). In addition, in this study, it was remarked that the pathogen was detected by 24 h enrichment from bologna type sausages with hotdog prepared by inoculation of *L. monocytogenes* with another FOB with $10\text{-}10^3$ cfu/g. In another *L. monocytogenes* detection study of ≤ 10 cfu/ml at count over 20 hours using FOB and EWF, it was reported that enrichment increased antigen expression, an increase in detection occurred, and total detection time after enrichment did not exceed 20-45 minutes (Tims et al. 2001). In a study conducted with FOB developed by using polystyrene guide wave for multiplex determination of *L. monocytogenes* and three other important pathogen bacteria from fast food meat products, it was reported that FOB determined these pathogens multiplex at a concentration of 10^3 cfu/ml from bovine, chicken and turkey meat samples after inoculated at a

level of approximately 10^2 cfu/25 g from each pathogen following to incubated 18 h. Furthermore, it is stated that each pathogen can be identified successfully in less than 24 hours from enriched meat samples with FOB in this study (Ohk and Bhunia 2013). In another study in which the combination of antibody and aptamer was shown to be a functional FOB model, it has been reported that *L. monocytogenes* could be detected as 10^3 cfu/ml in both pure and mixed bacterial cultures with Aptamer-A8, which is a single specific ligand targeted to internalin A in single chain and oligonucleotid structure, and biotinylated polyclonal P66 antibody. In addition, it is stated that this method has the potential to detect the pathogen in case 18 hours of enrichment is made after the inoculation of *L. monocytogenes* as 10^2 cfu/25 g in low rate for ready-to-eat meat products such as sliced meat, chicken and turkey (Ohk et al. 2010).

OBS's superiority in selectivity and sensitivity in the research of foodborne pathogens has put these sensors in the most popular category. Among the OBSs, the FOSs are the first commercial sensors marketed by Research International (Monroe, WA) (Arora et al. 2011). It is reported that *L. monocytogenes* can be detected with a predefined commercial FOS end sensor (RAPTOR™) (Kim et al. 2006). In a hot dog sample with this sensor, it was reported that the pathogen in the buffer solution could be identified as 5.4×10^7 cfu/ml, and if the flow process was applied, the number could be reduced to 1×10^3 cfu/ml (Nanduri et al. 2006). In the study of bologna sausages and hotdog ones contaminated at a rate of 10-1000 cfu/g and ones contaminated in a natural way, biotin-streptavidin reaction was used to collect pathogen on optical fiber and the identification was completed by using polystyrene fiber waveguides in less than 24 hours (Geng et al. 2004). In a study in which an optical biosensor was developed to use quantum dots with magnetic nano beads for rapid and specific detection of *L. monocytogenes* and the fluorescence intensity was measured with a probe produced from optical fiber material, *L. monocytogenes* was isolated in very short time as 1.5 hours in decimal dilutions prepared from pure cultures and counted very low concentrations such as 2-3 cfu/ml (Wang et al. 2007).

In conclusion, to date, pathogen determinations have generally been made by performing binding affinity, which can vary or degrade between antibodies and specific antigens. In this sense, biosensors are easy to use, close to real-time results in sensitivity and selectivity comparable to culture methods. With these devices, highly complex samples can be studied without the need for enrichment, without significant reduction in sensitivity or selectivity. Their uses are critical in providing on-site monitoring of pathogens from food matrices. Despite the current research, their potentials can be increased in many respects, especially the specificity of distinguishing target bacteria from multiple organism matrices, direct bacterial detection sensitivity without any enrichment, getting close to real-time results, overcoming natural technical deficiencies, and reducing false positive result numbers. It has become controversial due to the need to check for reliability, robustness and reproducibility in bacterial detection. Another important consideration is the design, which is relatively simple and inexpensive. The conventional enrichment and identification methods of *L. monocytogenes* have proven to be highly sensitive. However, the practical application of these methods is slow due to the multi-step processing of samples during analysis, such as enrichment and separation.

Biosensor-based methods are needed for accurate and rapid detection. Among the biosensors used in identification, optical ones provide better sensitivity than others, especially electrochemical ones, but this method is

limited by cost and performance complexity. Their uses are not yet in a specific order and needs to be improved.

REFERENCES

- Abdelhaseib MU, Singh AK, Bailey M et al. (2016). Fiber optic and light scattering sensors: Complimentary approaches to rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples. *Food Control* 61, 135-145.
- Aguiar ZP, Fritsch I (2003). Immobilized enzyme-linked DNA-hybridization assay with electrochemical detection for *Cryptosporidium parvum* hsp70 mRNA. *Anal Chem* 75, 3890-3897.
- Ahmad M, Hench LL (2005). Effect of taper geometries and launch angle on evanescent wave penetration depth in optical fibers. *Biosens Bioelectron* 20, 1312-1319.
- Anderson GP, Golden JP, Ligler FS (1993). A Fiber Optic Biosensor - Combination Tapered Fibers Designed for Improved Signal Acquisition. *Biosens Bioelectron* 8, 249-256.
- Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N et al. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens Bioelectron* 28, 1-12.
- Bergwerff AA, Van Knapen F (2006). Surface plasmon resonance biosensors for detection of pathogenic microorganisms: Strategies to secure food and environmental safety. *J Aoc Int* 89, 826-831.
- Buck JA (1995). *Fundamentals of Optical Fibers*, A John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bures J, Ghosh R (1999). *JOSA A*. *JOSA A* 16, 1992-1996.
- Chen GY (2004). Profile optimization of tapered waveguide sensors by fluorescence imaging. *P Soc Photo-Opt Ins* 5589, 70-77.
- Chlebicz A, Slizewska K (2018). *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*. *Int J Env Res Pub He* 15.
- Díaz-Herrera N, Navarrete M, Esteban O et al. (2003). A fibre-optic temperature sensor based on the deposition of a thermochromic material on an adiabatic taper. *Meas Sci Technol* 15, 353.
- Dover JE, Hwang GM, Mullen EH et al. (2009). Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. *J Microbiol Methods* 78, 10-19.
- Geng T, Morgan MT, Bhunia AK (2004). Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* cells by using a fiber-optic immunosensor. *Appl Environ Microb* 70, 6138-6146.
- Guo S, Albin S (2003). Transmission property and evanescent wave absorption of cladded multimode fiber tapers. *Opt Express* 11, 215-223.
- Hearty S, Leonard P, Quinn J et al. (2006). Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 66, 294-312.
- Iqbal SS, Mayo MW, Bruno JG et al. (2000). A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens Bioelectron* 15, 549-578.
- Joung HA, Shim WB, Chung DH et al. (2007). Screening of a specific monoclonal antibody against and detection of *Listeria monocytogenes* whole cells using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnol Bioproc E* 12, 80-85.
- Kharat HJ, Kakde KP, Shirale DJ et al. (2006). Designing of optical fiber sensing probe. *Fiber Integrated Opt* 25, 411-422.
- Kim G, Morgan MT, Ess D et al. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* using an automated fiber-optic biosensor: RAPTOR. *Key Eng Mater* 321-323, 1168-1171.
- Koubova V, Brynda E, Karasova L et al. (2001). Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensor Actuat B-Chem* 74, 100-105.
- Lathrop AA, Jaradat ZW, Haley T et al. (2003). Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactive monoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor. *J Immunol Methods* 281, 119-128.
- Lee CK, Itoh T, Ohashi T et al. (1997). Development of a piezoelectric self-excitation and self-detection mechanism in PZT microcantilevers for dynamic scanning force microscopy in liquid. *J Vac Sci Technol B* 15, 1559-1563.
- Leonard P, Hearty S, Quinn J et al. (2004). A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* 19, 1331-1335.
- Mackenzie HS, Payne FP (1990). Evanescent Field Amplification in a Tapered Single-Mode Optical Fiber. *Electron Lett* 26, 130-132.
- Marusov G, Sweatt A, Pietrosimone K et al. (2012). A Microarray Biosensor for Multiplexed Detection of Microbes Using Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance Imaging. *Environ Sci Technol* 46, 348-359.
- Mignani AG, Falciai R, Ciaccheri L (1998). Evanescent wave absorption spectroscopy by means of bi-tapered multimode optical fibers. *Appl Spectrosc* 52, 546-551.
- Mor-Mur M, Yuste J (2010). Emerging Bacterial Pathogens in Meat and Poultry: An Overview. *Food Bioprocess Tech* 3, 24-35.
- Nanduri V, Bhunia AK, Tu SI et al. (2007). SPR biosensor for the detection of *L.monocytogenes* using phage-displayed antibody. *Biosens Bioelectron* 23, 248-252.
- Nanduri V, Kim G, Morgan M et al. (2006). Antibody immobilization on waveguides using a flow-through system shows improved *Listeria monocytogenes* detection in an automated fiber optic biosensor: RAPORTM. *Sensors* 6, 808-822.
- Ohk SH, Bhunia AK (2013). Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* from ready-to-eat meat samples. *Food Microbiol* 33, 166-171.
- Ohk SH, Koo OK, Sen T et al. (2010). Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *J Appl Microbiol* 109, 808-817.
- Poltronieri P, de Blasi MD, D'Urso OF (2009). Detection of *Listeria monocytogenes* through real-time PCR and biosensor methods. *Plant Soil Environ* 55, 363-369.
- Rich RL, Myszkowski DG (2001). BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J Mol Recognit* 14, 223-228.
- Rijal K, Leung A, Shankar PM et al. (2005). Detection of pathogen *Escherichia coli* O157: H7 AT 70 cells/mL using antibody-immobilized biconical tapered fiber sensors. *Biosens Bioelectron* 21, 871-880.
- Schmelcher M, Shabarova T, Eugster MR et al. (2010). Rapid Multiplex Detection and Differentiation of *Listeria* Cells by Use of Fluorescent Phage Endolysin Cell Wall Binding Domains. *Appl Environ Microb* 76, 5745-5756.
- Shankaran DR, Gobi KVA, Miura N (2007). Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensor Actuat B-Chem* 121, 158-177.
- Sharma H, Mutharasan R (2013). Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins. *Sensor Actuat B-Chem* 183, 535-549.
- Sheeba M, Rajesh M, Vallabhan CPG et al. (2005). Fibre optic sensor for the detection of adulterant traces in coconut oil. *Meas Sci Technol* 16, 2247-2250.
- Sireli UT, Erol I (1999). Detection of listeria species in minced beef. *Turk J Vet Anim Sci* 23, 373-380.
- Soni DK, Ahmad R, Dubey SK (2018). Biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*: emerging trends. *Crit Rev Microbiol* 44, 590-608.
- Taylor AD, Ladd J, Yu Q et al. (2006). Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosens Bioelectron* 22, 752-758.
- Tims TB, Dickey SS, Demarco DR et al. (2001). Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* within 20 hours using an evanescent wave biosensor. *Am Clin Lab* 20, 28-29.
- Tubb AJC, Payne FP, Millington RB et al. (1997). Single-mode optical fibre surface plasma wave chemical sensor. *Sensor Actuat B-Chem* 41, 71-79.
- Turner AP (2000). Biosensors--sense and sensitivity. *Science* 290, 1315-1317.
- Villatoro J, Luna-Moreno D, Monzon-Hernandez D (2005). Optical fiber hydrogen sensor for concentrations below the lower explosive limit. *Sensor Actuat B-Chem* 110, 23-27.
- Walland J, Lauper J, Frey J et al. (2015). *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. *Schweiz Arch Tierh* 157, 319-328.
- Wang H, Li YB, Slavik M (2007). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor. *J Rapid Meth Aut Mic* 15, 67-76.
- Zhang XG, Kitaoka H, Tsuni S et al. (2014). Development of a Simultaneous Detection Method for Foodborne Pathogens Using Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Food Sci Technol Res* 20, 317-325.



Spontaneous Tuberculosis Cases In Two Pigeon Flocks

Ayhan ATASEVER^{ID} Görkem EKEBAŞ^{ID}

Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Patology, Kayseri, Turkey

Received: 01.04.2019

Accepted: 04.12.2019

ABSTRACT

In this study, a 2-year-old female rock pigeon and two 4-month-old tumbler domestic pigeon brought to Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, for necropsy were diagnosed as tuberculosis. On the macroscopic examination, several nodules with yellowish colour were seen in the pulmonary sections as well as in the rock pigeon. The grey-yellowish nodules were found on the right wings (1 x 1.5 x 0.8 cm in size), the liver surface and the jejunum in the small intestine (with a size ranging from 0.5-1 mm to 1 cm) and near the craw (0.3 x 0.8 cm in size) of the one tumbler pigeon. In other, grey-yellowish nodular structures were seen in the lungs 1 x 1.2 x 0.5 cm and 0.5 x 0.7 x 0.6 cm in the liver. Histopathological examination showed that these lesions were tuberculous lesions consisting of homogeneous eosinophilic colorized casein necrosis, surrounding multi-nucleated giant cells, epithelioid histiocytes, histiocytes, lymphocytes and, most extensively, typical tubercles with a fibrous capsule. According to In the Ziehl-Neelsen staining, tuberculous bacillus was not observed in the tissue of rock pigeon, while tuberculous bacillus was found in a large number of dense red in tubercle structures in both of the tumbler pigeons. Because of the zoonotic nature of the agent and the risk of contamination, it was evaluated as a case report.

Keywords: Histopathology, Pigeon, Tuberculosis

ÖZ

İki Güvercin Sürüsünde Spontanöz Tüberküloz Vakaları

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na nekropsi amacıyla getirilen 2 yaşlı dişi kaya-cami güvercini ve 4 aylık 2 adet evcil taklacı güvercinde tüberküloz olgusu tanımlandı. Makroskopik incelemede, kaya güvercininde kaşektik tablo ile birlikte akciğer kesitlerinde toplu iğne başı büyüklüğünde sarımtırak renkte birkaç nodül görüldü. Taklacı güvercinlerin bir tanesinin sağ kanat altında gri-sarımtırak renkte 1 x 1.5 x 0.8 cm ebatlarında, karaciğer yüzeyinde ve barsakta jejunum üzerinde 0.5-1 mm'den 1 cm'ye kadar değişen büyüklükte, kursağa yakın 0.3 x 0.8 cm'lik gri-sarımtırak renkte nodüllerin varlığı dikkati çekti. Diğer taklacı güvercinde ise akciğerde 1 x 1.2 x 0.5 cm ve karaciğerde 0.5 x 0.7 x 0.6 cm ebatlarında gri-sarımtırak renkte nodüler yapılar görüldü. Histopatolojik incelemede bu nodüller lezyonların homojen eozinofilik renkte kazeifikasyon nekrozu olduğu, bunların çevresinde çok çekirdekli dev hücreleri, epitelioid histiyositler, histiyosit, lenfosit ve en dışta da fibröz bir kapsülden oluşan tipik tüberküllerden oluşan tüberküloz lezyonları olduğu gözlemlendi. Yapılan Ziehl-Neelsen boyamasında kaya güvercininde tüberküloz basilleri gözlenmezken, taklacı güvercinlerin her ikisinde de tüberkül yapılarında çok sayıda yoğun kırmızı renkte küçük kümeler halinde tüberküloz basilleri tespit edildi. Etkenin zoonoz karakterde olması ve kontaminasyon riski nedeniyle olgu sunumu şeklinde değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Güvercin, Histopatoloji, Tüberküloz

INTRODUCTION

Tuberculosis is a chronic and contagious disease caused by *Mycobacterium avium* in poultry (Thoen and Karlson 1991). Although most of the poultry tuberculosis is reported in chickens (Gonzalez et al. 2002), it has also been reported in turkey (Gerhold and Fischer 2005), goose (Oruç and Bali 2004), pigeon (Bougiouklis 2005; Terim Kapakin et al. 2010; Terim Kapakin and Alçıgır 2009), ostrich (Garcia et al. 2001), quail (Tell et al. 2003),

pheasant (Hsieh et al. 2009), psittacine birds (Lennox 2007), parrots, budgerigars, canaries, eagles and other domestic and wild birds (Thoen and Karlson 1991). In particular, while pigeons are highly resistant to *M. avium* infection, pheasants are susceptible to disease (Singbeil et al. 1993; Hejlcek and Tremel 1994).

In poultry tuberculosis without clinical-pathological findings, the transmission is transmitted through respiration and digestion (infected feed and water), so that infected birds can infect each other and humans (Thoen

and Karlson 1991; Möbius et al. 2006; Fulton and Thoen 2000; Özcan et al. 2001; Kriz et al. 2010).

In recent years, the zoonosis tuberculosis has been observed in the pigeons, was fed for a hobby. Due to effects on public health, this research plays an important role in providing different perspective on literature.

CASE HISTORY

In the study, cachexia 2 years old, a female rock- mosque pigeon (*Columba livia*) and cachectic and other non-diarrhea without any signs of death were seen in two 4-month old tumbler pigeons (*Columba domestica*) were brought in the Erciyes University, Faculty of Veterinary Pathology Department in order to necropsy.

In this study 200 food handlers from different plants were interviewed. Questionnaires were responded individually, in the presence of the researcher, 30 minutes time required for completion.

Tissue samples from pigeons with systemic necropsy were detected in 10% buffered formaldehyde. The detected tissues were blocked after trimming and the sections of 5-6 micron thickness were stained with hematoxylin-eosin (HE). In addition, selected sections were stained with Ziehl-Neelsen (ZN) method and evaluated under a light microscope.

In rock pigeon necropsy, no macroscopic lesion was found except a few yellowish nodules on the lung sections. In the necropsy of one tumbler pigeon, one nodule, 1 x 1.5 x 0.8 cm, (Figure 1A) was located under right wing of one of them, other was on the surface of liver that has grown considerably and has a size ranging from 0.5-1 mm to 1 cm (Figure 1B) and on the jejunum of the intestine (Figure 1C). The grey-yellowish nodules, 0.3 x 0.8 cm, were found near the craw (Figure 1D). 1 x 1.2 x 0.5 cm (Figure 2A) and 0.5 x 0.7 x 0.6 cm grey-yellowish nodular (Figure 2B) were seen in the lung and in the liver, respectively in the other tumbler pigeon.



Figure 1. A. View of the mass of 1 x 1, 5 x 0,8 cm in gray-yellowish color under wing. B. The appearance of nodular structures ranging from 0.5-1 mm to 1 cm on the enlarged liver surface. C-D. Appearance of gray-yellowish nodules 0,3 x 0,8 cm on the jejunum.



Figure 2. Lung 1 x 1, 2 x 0,5 cm (A), liver in the size of 0.5x0.7x0.6 cm (B) size of the gray-yellowish-colored nodular structures.

Histopathological examination showed that these lesions were tuberculous lesions consisting of homogeneous eosinophilic colorized casein necrosis, surrounding multi-nucleated giant cells, epithelioid histiocytes, histiocytes, lymphocytes and, most extensively, typical tubercles with a fibrous capsule in the rock pigeon of lung and spleen (Figure 3 A, B, C, D). Tuberculosis bacilli were not observed in Ziehl-Neelsen staining. In both of the tumbler pigeons, several caseous necroses of homogenous eosinophilic including multiple masses in the lungs, liver, spleen and intestines, below the wings, multinucleated giant cells, epithelioid histiocytes, histiocytes, lymphocytes and extrinsic a fibrous capsule are observed. (Figure 4 A, B, C, D, E). In Ziehl-Neelsen staining, tubercles were observed in small mass of tuberculosis bacilli (Figure 4 A', B', C', D', E').

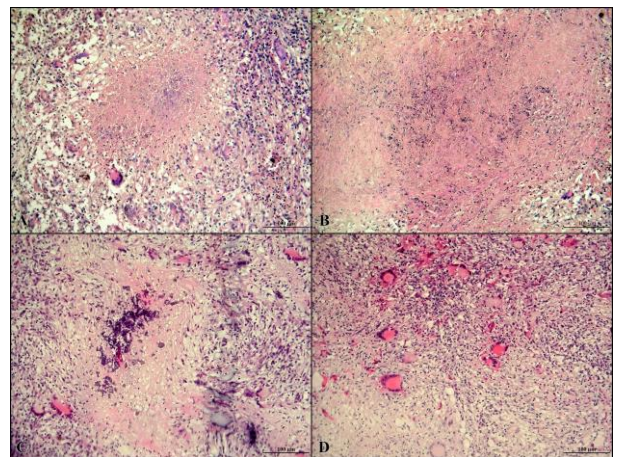


Figure 3. The appearance of typical tubercle structures in the lungs (A, B, C), in the homogenous eosinophilic case, in case of necrosis of caseinification, multinucleated giant cells around it, epithelioid histiocytes, histiocytes, lymphocytes and a fibrous capsule at the outermost. Necrosis of caseinification in the spleen (D) homogenous eosinophilic color, the appearance of multinucleated giant cells around them, H x E.

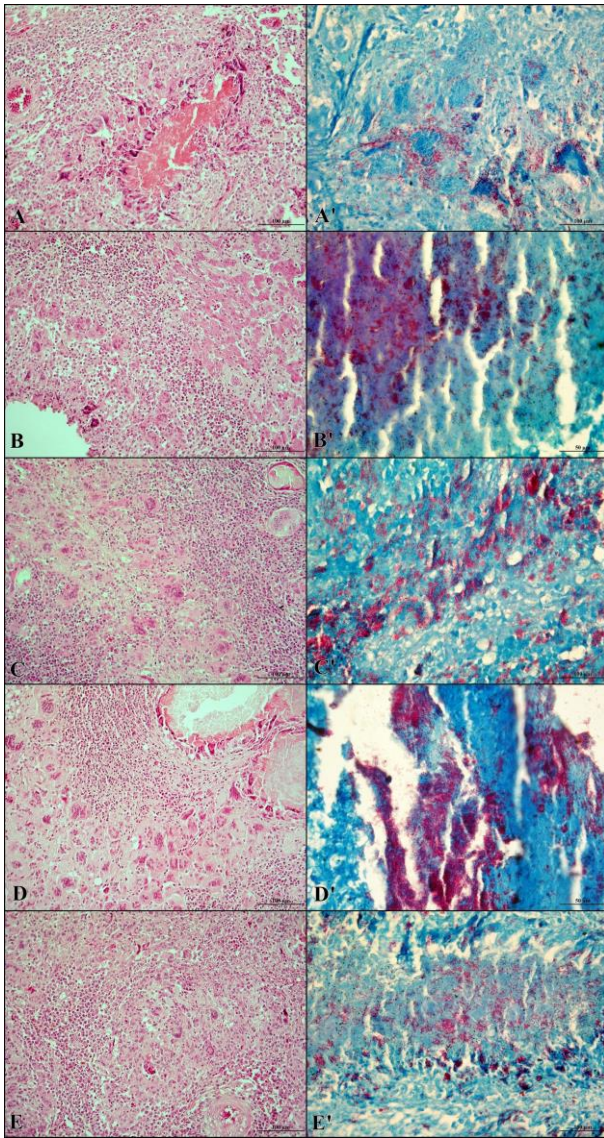


Figure 4. Lung (A), liver (B), mass under wing (C), spleen (D) and intestine necrosis focuses on homogenous eosinophilic color in intestines (E), multinucleated giant cells around them, epithelioid histiocytes, histiocytes, lymphocytes and the outermost appearance of typical tubercle structures consisting of a fibrous capsule, Hx&E. Tuberculosis bacilli in small clusters in the tubercle structures found in the lung (A'), liver (B'), mass under the wing (C'), spleen (D') and intestines (E'), ZN.

DISCUSSION

Rarely, tuberculosis in domestic animals has been observed and not only tuberculosis but also poultry tuberculosis has played an important role in zoonotic infections. Therefore, poultry tuberculosis is a disease with high mortality and morbidity and is of great importance because it is highly contagious (Fulton and Thoen 2000;

REFERENCES

- Bougiouklis P, Brellou G, Fragkiadaki E, Iordanidis P, Vlemmas I, Georgopoulou I (2005).** Outbreak of Avian Mycobacteriosis in a flock of two-year-old domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Avian Dis*, 49, 442-445.
- Fulton RM, Thoen CO (2000).** Tuberculosis. In: *Diseases of Poultry*, Ed: Saif YM, 11th Ed., 836-844, Iowa State Press, Ames.
- Garcia A, LeClear C, Gaskin J (2001).** *Mycobacterium avium* infection in an ostrich. (*Struthio camelus*). *J Zoo Wildl Med*, 32, 96-100.

Gerhold and Fischer 2005; Kriz et al. 2010). This disease leads to loss of yield, so it has been eradicated by modern poultry companies. However, it can be observed in wild birds (Thoen and Karlson 1991; Bougiouklis 2005). In poultry tuberculosis, lesions usually occur in the liver, spleen, intestines and bone marrow. Rarely, lung, heart, kidney, pancreas, brain, ovary, testis, skeletal muscles, skin, face, beak and eye can be found around. Although lesions vary in size and number, they are yellow-grey-white nodules (Fulton and Thoen 2000; Tell et al. 2003; Bougiouklis 2005). In the present case, the lesion was seen microscopically in the rock mosque pigeon only when the similar nodule was seen during the trimming process after the first fixation. In one of tumbler pigeons, similar nodular structures were seen under the right wing, liver, intestine and lung.

Histopathological examination of central caseous necrosis, multinucleated giant cells, epithelioid histiocytes, lymphocyte and inflammation table consisting of histiocytes is observed. This inflammation consisting of fibrocytes and fibroblasts around the encapsulated cells are restricted to a varying thickness (Thoen and Karlson 1991; Garcia et al. 2001; Gonzalez et al. 2002; Tell et al. 2003; Gerhold and Fischer 2005; Bougiouklis 2005; Terim Kapakin et al. 2010; Terim Kapakin and Alçıgır 2009). Microscopic lesions were consistent with those reported in the literature. Calcification observed in both human and mammalian tubercles is very rare in poultry tuberculosis (Fulton and Thoen 2000). Although rare calcification areas are observed in the reported cases, calcification was observed in almost all necrosis areas in this case. The tuberculosis agents are seen as small globules in small groups in the Ziehl-Neelsen special staining (Fulton and Thoen 2000; Özcan et al. 2001; Gonzalez et al. 2002; Tell et al. 2003; Gerhold and Fischer 2005; Bougiouklis 2005; Terim Kapakin et al. 2010). Microscopic lesions in the implanted pigeons were consistent with those reported in the literature. Microbiological examinations performed for the isolation of the three of the pigeons were negative. The cause of the negativity is not explained to the pigeons, but it is attributed to the animal owner giving antibiotic treatment in the pigeons.

The fact that a large part of the rock pigeons is found free in nature makes it difficult to detect the dead animals. Generally, the use of mosque roofs and squares as shelter areas causes difficulties in taking measures. These pigeons, which are fed by young children in the courtyard and squares of mosques, pose a potential danger to the air by the respiratory tract for other animals and people with their feces carrying dust and contaminated soil during their flight. In Turkey, a tumbler pigeon breeding is carried out in order to obtain both pleasure and economic income in some regions and this situation is increasing day by day. The fact that rarely literature data on pigeon tuberculosis is also emphasized in this case report since it can be important for pigeon breeding.

- Gerhold RW, Fischer JR (2005).** Avian tuberculosis in a wild turkey. *Avian Dis*, 49 (1), 164-166.
- Gonzalez M, Rodriguez-Bertos A, Gimeno I, Flores JM, Pizarro M (2002).** Outbreak of avian tuberculosis in 48-week-old commercial layer hen flock. *Avian Dis*, 46 (4), 1055-1061.
- Hejlceek K, Tremli F (1994).** Epizootiology and pathogenesis of avian mycobacteriosis in domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Vet. Med*, 39 (10), 615-624.
- Hsieh YC, Tsai KY, Wang CY, Hung CN, Tsai SS, Liu HJ (2009).** Diagnosis of avian tuberculosis in Swinhoe's pheasants. Using conventional and molecular-based techniques. *Avian Dis*, 53, 629-33.

- Kriz P, Slaný M, Shitaye JE, Pavlík I (2010).** Avian mycobacteriosis in humans remains a threat in the Czech Republic. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 16 (1), 10-17.
- Lennox AM (2007)** Mycobacteriosis in companion psittacine birds: a review. *J. Avian Med Surg*, 21, 181-187.
- Möbius P, Lentzsch P, Moser I, Naumann L, Martin G, Köhler H (2006).** Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet Microbiol*, 117, 284-291.
- Oruç E, Bali AF (2004).** Tuberculosis in a young ostrich. *Veterinarium*, 1, 23-26.
- Özcan K, Beytut E, Tuzcu M (2001).** Tuberculosis in geese (*Anser anser*) in Turkey. *Avian Dis*, 45, 755-759.
- Singbeil BA, Bickford AA, Stoltz JH (1993).** Isolation of *Mycobacterium avium* from ringneck pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Dis*, 37, 612-615.
- Tell L, Woods L, Foley J, Needham M, Walker RA (2003).** Model of avian mycobacteriosis: clinical and histopathologic findings in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) intravenously inoculated with *Mycobacterium avium*. *Avian Dis*, 47, 433-443.
- Terim Kapakin KA, Sağlam YS, Altun S (2010).**
- Terim Kapakin KA, Alçıgır G (2009).** Bir güvercinde tüberküloz olgusu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (3), 477-479.
- Thoen CO, Karlson AG (1991).** Tuberculosis. In, Diseases of Poultry, Ed; Calnek BW, Barnes HJC, Beard W, Reid MW, Yoder HW, 9th Ed., 172-185, Iowa State University Press, Ames.



VAN VETERINARY JOURNAL



Article Copyright Transfer Agreement Form

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

Title of the article:

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

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

Authorized Researcher

Title, Name-Surname :

Full Address :

e- mail :

Tel, Fax :

Date and Signature :



Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is ***Van Vet J.***
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication. Article plagiarism report: Before submitting an article to our journal, the similarity of the article should be determined and uploaded to the system with appropriate plagiarism software programs (iThenticate, Turnitin etc.). The similarity rate below 25% is accepted by our Editorial Board. Articles that are over this determined rate are returned to the author.
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://dergipark.gov.tr/vanvetj> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures, graphs and references; original article should not exceed 15 pages, short paper and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 250 words. Abstract should include **Aim, Material and Methods, Results and Suggestion.**
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system. In addition, if there is a requirement and necessity for "Ethics Committee Approval" in scientific studies sent to our journal, explanatory information including the name, number and date of the ethics committee from which the ethics committee approval /

permit document was obtained should be clearly stated in the material and method section.

9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.

10- **Copyright Transfer Agreement Form** should be signed by all authors and submitted electronically by uploading manuscript.

11- Apart from tables all visual elements (Graphics, photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **Figure**. Tables and graphs are named as it is.

12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish** and **English** in the text. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations used in the table and necessary explanations should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

13- **Cover file** should be created and uploaded to the system. **Title Page: Turkish and English titles, author names, institutional information (English and Turkish), projects, congresses, ethics, etc. information should be provided. [Click here for Sample Title Page.](#)**

14- **Original Article:**

Main Text File: Title. Short Title. Abstract and Keywords, English title, Introduction with Abstract and Keywords, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgment or Information (if any), References. Each Table and Figure should be on separate pages.

Case Reports:

Scientific works in which the authors encounter new or rare observed cases. Maximum 15 sources should be used and attention should be paid to the possibility of current sources. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Paper:

It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. It should contain no more than 2 tables and figures.

15- References should be listed according to authors surname alphabetically (APA Citation type). In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the **Web of Science**. For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:

Articles:

Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015). Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.

Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015). Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989

Books:

Marrow DA (1986). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Books chapters:

Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.

Electronic Material: The name of the article and available web address and access date should be written.

Anonymus

(1) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ Access date: 10 January 2009.

Thesis:

Mis L (2009). The effect of zinc inadequate diet and the addition of zinc on lipid peroxidation and erythropoietin levels in rats with experimental renal failure. PhD thesis, Van Yüzüncü Yıl University Institute of Health Sciences, Van.

Paper Submitted at the Scientific Meeting:

Oğuz B (2018). Molecular Analysis of *Echinococcus granulosus* through Amplification of COX1 Gene Fragments from Sheep in Van province. In: Proceeding of the 1st International GAP Agriculture and Livestock Congress, Sanliurfa, Turkey.

16- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>). Up to 5, including one under the abstract should be given in both languages.

17- Article publications in this Journal is FREE.

18- Copyright fee will not be paid to the author(s).

19- Van Veterinary Journal uses double-blind review procedure, which both the reviewer and author identities are concealed from each other throughout process. Authors approve to submit their manuscript in compliance with the double-blind review policy.

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

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