



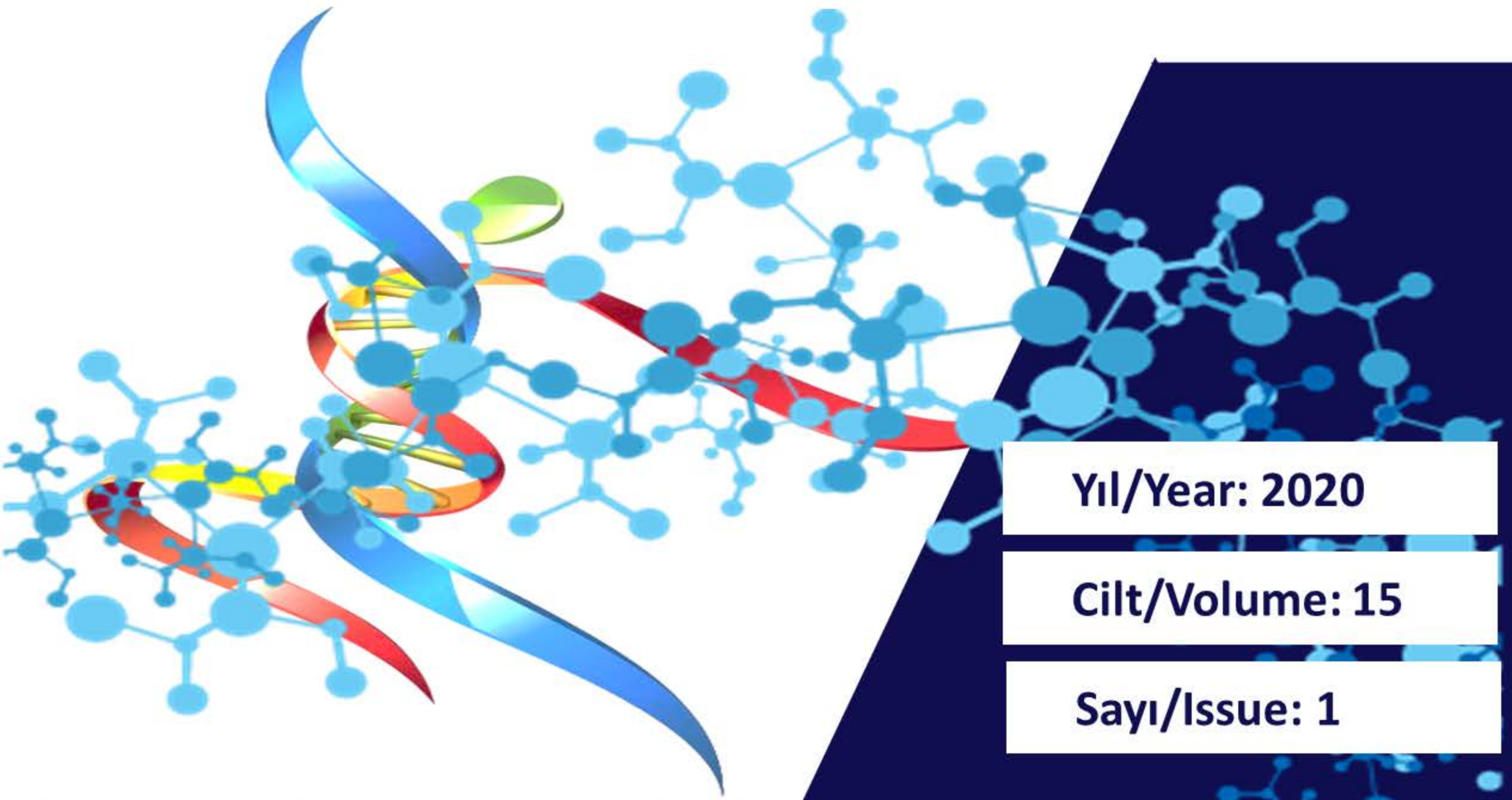
ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Veteriner Bilimleri Dergisi

ATATÜRK UNIVERSITY

Journal of Veterinary Sciences



Yıl/Year: 2020

Cilt/Volume: 15

Sayı/Issue: 1

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

**Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi**

**Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences**

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

Nisan/April

Yıl/ Year: 2020

Cilt/Volume: 15

Sayı/Issue: 1



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



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ADINA SAHİBİ / OWNER

Prof. Dr. Hamza AVCIOĞLU

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Baş Editör / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ

Editör Yardımcıları / Associate Editors

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

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

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

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

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

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

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

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

YAYIN KURULU ÜYELERİ / EDITORIAL BOARD MEMBERS

Dr. Mustafa Atasever, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Zekai Halıcı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Mustafa Alişarlı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Ardita Jahja-Hoxha, KOSOVA / KOSOVO

Dr. Aleksandra Gorecka-Bruzda, POLONYA / POLAND

Dr. Daniel Zahner, ALMANYA / GERMANY

Dr. Eva Voslarova, ÇEK CUMHURİYETİ / CZECH REPUBLIC

Dr. Tanvir Rahman, BANGLADEŞ / BANGLADESH

Sekreteryaya ve Web Tasarım *Secretariat and Web Design*

Doç. Dr. Serdar ALTUN

Dizgi *Typesetter*

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL

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

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

Yazışma Adresi / Correspondence Address

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

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

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

Yıl / Year: 2020

Cilt / Volume: 15

Sayı / Issue : 1

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

- Prof. Dr. Fatmagül YUR, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fethiye Sağlık Bilimleri Fakültesi, Muğla, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Aysun ÇEVİK DEMİRKAN, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Dursunali ÇINAR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Gürkan UÇAR, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Hikmet KELEŞ, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Burdur, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Başak HANEDAN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Elif DOĞAN, Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kastamonu, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Emrah Hicazi AKSU, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Erhan ÖZENÇ, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Mehmet Önder KARAYİĞİT, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sivas, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Murat SELÇUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Samsun, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Semra KAYA, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Serkal GAZYAĞCI, Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kırıkkale, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Demet ÇELEBİ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Fırat DOĞAN, Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hatay, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Mümin Gökhan ŞENOCAK, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Nuvit COŞKUN, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Volkan GELEN, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.

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

Araştırma Makaleleri / Research Articles

▶ Askan Arslan, Ali Haydar KIRMIZIGUL. Serum Amyloid-A, Haptoglobin and Ceruloplasmin Levels in Dogs Infected with <i>Sarcoptes canis</i> (<i>Sarcoptes canis</i> ile Enfekte Köpeklerde Serum Amiloid-A, Haptoglobin ve Seruloplazmin Seviyelerinin Belirlenmesi).	1-6
▶ Farid MAHD-GHAREHBAGH, Siamak KAZEMI-DARABADI, Hamid AKBARI. Prevalence of Foot Lesions Among the Slaughtered Cattle in the Northwest of Iran (<i>İran'ın Kuzeybatısında Kesilen Büyükbaş Hayvanlarda Ayak Lezyonlarının Görülme Sıklığı</i>).	7-13
▶ Ramzi Abdulghafoor Abood AL-AGELE. The Study of Histological Observations of Ovine Claw Coronary Region and the Architecture Morphology of Arterial Anastomosis of This Area (<i>Koyun Tırnak Koroner Bölgesinin Histolojik İncelemesi ve Arteriyel Anastomozunun Yapısal Morfolojisi</i>).	14-21
▶ Aykut ULUCAN, Hayati YUKSEL, Emre SAHİN, Seda YAKUT. The Role of Serum Amyloid-A in Formaldehyde-Induced Kupffer Cell Apoptosis in Rats and Possible Protective Effects of Astaxanthin in This Process (<i>Serum Amiloid-A'nın Sıçanlarda Formaldehit Kaynaklı Kupffer Hücre Apoptozundaki Rolü ve Astaksantin'in Bu Süreçteki Olası Koruyucu Etkileri</i>).	22-30
▶ Nurcan DONMEZ, Ercan KESKİN, Mehmet OZSAN, Omer Mahruf Ali SHOSHİN, Bekir MEHTAP. The Favorable Effect of Swimming on Some Blood Parameters in Diabetic Rats (<i>Diyabetik Sıçanlarda Yüzmenin Bazı Kan Parametreleri Üzerine Olumlu Etkisi</i>).	31-37
▶ Israa Abdulghani AL-ROBAIEE, Maab Ibrahim AL-FARWACHI. Some Clinicopathological Changes in Buffalo Calves Infected with Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) K99* Detected by Direct ELISA (<i>Direkt ELISA ile Tanısı Konmuş, Enterotoksijenik E. coli (ETEC) K99* ile Enfekte Manda Yavrularındaki (Malak) Bazı Klinikopatolojik Değişiklikler</i>).	38-42
▶ Emin KARAKURT, Serpil DAG. Protective Effect of Silymarin on Diethylnitrosamine Induced Hepatocellular Carcinoma Model in Wistar Rats; Cancer Patterns and Cytological Variants (<i>Wistar Ratlarında Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Hepatoselüler Karsinom Modelinde Silimarin'in Koruyucu Etkisi; Kanser Paternleri ve Sitolojik Varyantlar</i>).	43-50
▶ Korhan ÖZTURAN, Mustafa ATASEVER. Erzurum ve Çevresinde Üretilen Süt ve Süt Ürünlerinin Mevsimlere Göre Mineral Madde ve Ağır Metal İçeriği (<i>Mineral and Heavy Metal Contents of Milk and Milk Products Produced in Erzurum Province According to Seasons</i>).	51-62
▶ Zekeriya ÖZÜDOĞRU, Hatice ÖZDEMİR. Hasak Koyunlarının Akciğer Damarları Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma (<i>A Macroanatomic Study on Lung Vessels in Hasak Sheep</i>).	63-69
▶ Sedat ÇETİN, Ayşe USTA, Pınar EKİCİ, Semiha DEDE, Veysel YÜKSEK. <i>Sarcoptes ovis</i> ile Enfekte Koyunlarda Serum Protein Fraksiyon Profili (<i>Serum Protein Fraction Profile in Sheep Infected with Sarcoptes ovis</i>).	70-75

Derlemeler / Reviews

▶ Fırat KORKMAZ, Beste ÇİL. Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı (<i>The Use of Flow Cytometry in Semen Quality Analyses</i>).	76-83
▶ Damla Tuğçe OKUR, Bülent POLAT. Kedi ve Köpeklerde Sezaryen ve Piyometra Operasyonlarında Anestezi Teknikleri (<i>Anesthesia Techniques in Cesarean and Pyometra Operations in Cats and Bitches</i>).	84-90
▶ Selvi Deniz DÖRTTAŞ, Seval BİLGE DAĞALP. Veteriner Hekimlikte Papillomaviruslar ve Önemi (<i>Papillomaviruses and Their Importance in Veterinary Medicine</i>).	91-99



Serum Amyloid-A, Haptoglobin and Ceruloplasmin Levels in Dogs Infected with *Sarcoptes canis**

Askan ARSLAN^{1a}, Ali Haydar KIRMIZIGÜL^{1b}✉

1. Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kars, TURKEY.
ORCID: 0000-0001-6117-7334^a 0000-0002-6660-2149^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
01.10.2019	31.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Arslan A, Kirmizigül AH: Serum Amyloid-A, Haptoglobin and Ceruloplasmin Levels in Dogs Infected with *Sarcoptes canis*. Atatürk University J. Vet. Sci., 15(1): 1-6, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.627356

Abstract: This study was aimed to determine serum amyloid-a (SAA), haptoglobin (Hp) and ceruloplasmin (Cp) levels in dogs infected with *Sarcoptes canis*. The animal material of the study was consisted of 25 dogs with different age, gender and race (13 female, 12 male) which were bearing symptoms such as itching, rash and crusting and were diagnosed as *Sarcoptes canis* in the clinics of Internal Medicine Department of Veterinary Faculty, Kafkas University. 10 healthy dogs of different age, sex and race (4 female, 6 male) were used for the control group. Biochemical analysis revealed that the SAA and Hp values of the sick animals were statistically different than healthy animals ($P<0.001$). Similarly, when the serum Cp values of sick animals were compared with those of healthy animals, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Obtained results showed that investigated acute phase proteins were found increased in dogs with *Sarcoptes canis* with local skin damage. It was concluded that acute phase proteins, SAA, Hp and Cp can be used as inflammatory indicators in sarcoptic mange in dogs.

Keywords: Ceruloplasmin, Dog, Haptoglobin, *Sarcoptes canis*, Serum Amyloid-A.

Sarcoptes canis ile Enfekte Köpeklerde Serum Amiloid-A, Haptoglobin ve Seruloplazmin Seviyelerinin Belirlenmesi

Öz: Bu çalışmanın amacı *Sarcoptes canis* ile enfeste köpeklerde serum amiloid-A (SAA), haptoglobin (Hp) ve seruloplazmin (Cp) seviyelerinin belirlenmesiydi. Çalışmanın hayvan materyalini, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniklerine, kaşıntı, deride döküntü ve kabuklanma şikayetleriyle getirilen, *Sarcoptes canis* tanısı konulan farklı yaş, cinsiyet ve ırkta (13 dişi, 12 erkek) 25 hasta köpek ve kontrol amaçlı yine farklı yaş, cinsiyet ve ırkta (4 dişi, 6 erkek) 10 sağlıklı köpek oluşturdu. Biyokimyasal analiz sonucunda hasta hayvanların SAA ve Hp değerleri ile sağlıklı hayvanların SAA ve Hp değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu ($P<0.001$) belirlendi. Aynı şekilde hasta hayvanların serum Cp değerleri ile sağlıklı hayvanların serum Cp değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın anlamlı olduğu görüldü ($P<0.05$). Bu sonuca göre genellikle yangı mediatörü olarak kullanılan akut faz proteinlerin lokal seyreden ve deri hasarı şekillenen uyuz köpeklerde yüksek bulunması bu hastalıkta da SAA, Hp ve Cp'nin yangı indikatörü olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Haptoglobin, Köpek, *Sarcoptes canis*, Seruloplazmin, Serum Amiloid-A.

✉ Ali Haydar Kirmizigül

Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 36100, Kars, TURKEY.
e-mail: ahkirmizigul@hotmail.com

*This article has been produced from the same-titled postgraduate thesis submitted to the Health Sciences Institute of Kafkas University.

INTRODUCTION

Skin diseases are very common in dogs. These diseases are mainly caused by ectoparasites (1,2). The most frequently observed skin disease of dogs is scabies (2,3). The majority of canine mange cases are caused by *Sarcoptes scabiei* (*var. canis*) sarcoptic mange is a non-seasonal zoonotic disease, which is characterized by intense pruritus and observed in several mammalian species including humans. This disease is generally localized to areas with less hair, such as the ventral abdomen and the medial surface of the legs, and is also observed in the form of miliary dermatitis in the periocular skin, pinna, elbows and their medial surface, and causes severe pruritus (2,4-7).

Tissue damage results in an acute phase response (APR). APR plays a role in the elimination of tissue damage and pathogens (8). Acute-phase proteins (APPs) are synthesized in the liver in reaction to inflammation and the APR, even before clinical disease symptoms appear. These proteins have various functions and features. While APPs are found at very low levels in healthy animals, their levels rapidly increase with inflammation (9). Haptoglobin (Hp) is an APP, which is synthesized in the parenchymal cells of the liver and freely circulates in the blood. Hp levels increase approximately 8 hours after the generation of inflammatory stimuli (10,11). Plasma haptoglobin levels increase in the event of several conditions such as inflammation, trauma, tissue damage, and malignant proliferation. On the other hand, plasma Hp levels decrease with haemolysis and severe hepatocellular damage. In view of these alterations observed in Hp levels, it is suggested that this parameter could be used for diagnostic purposes and the evaluation of the success of treatment (12).

Serum amyloid-A (SAA) is synthesized in the liver during inflammation and is used for distinguishing between inflammatory and non-inflammatory diseases, as well as for the monitoring of diseases, the assessment of the success of the

treatment applied and the prognosis of the disease (9,13,14).

Ceruloplasmin (Cp) is a protein responsible for the transport of copper in the blood plasma (8). Although known to be synthesized primarily in the liver, it is also produced in extrahepatic areas and the pulmonary epithelium (11,15,16). Cp catalyses the oxidation of toxic ferrous iron (Fe²⁺) into the nontoxic ferric iron (Fe³⁺), and thereby, protects tissues against free radical-induced damage (15).

This study was aimed at determining the levels of SAA, Hp and Cp, which are APPs that are used as indicators of inflammation, in dogs naturally infested with *Sarcoptes canis*.

MATERIALS and METHODS

Animal Material

The study was conducted after receiving approval from the Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee (KAU-HADYEK, Investigation code: 2017/096, No 2017/112). The study material comprised 25 sick dogs (13 females and 12 males), which were of different age, sex and breed and were diagnosed with sarcoptic mange upon being admitted to the clinic of the Internal Medicine Department of Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine with signs of pruritus, papular rash and scaling, and 10 healthy dogs (4 females and 6 males), which were also of different age, sex and breed.

Five-ml blood samples were taken from the V. cephalica accecorius of the sick and healthy dogs and were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes for the extraction of serum. The serum samples were stored at -20 °C until being used for biochemical analyses.

Parasitological Diagnosis

For the purpose of parasitological diagnosis, deep skin scrapings were taken from the skin lesions and were maintained in 10% KOH for 20 minutes.

Subsequently, these scrapings were examined under a light microscope at a magnification of 10X40.

Measurement of Serum Amyloid-A Levels

Serum amyloid-A levels were measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Tridelta Development Limited, Ireland). The SAA-specific kit included test strips, which were coated with monoclonal antibodies. Both the extracted serum samples and the reference samples with known SAA concentrations were added to the wells of the test strips together with anti-SAA monoclonal antibodies (conjugate). In this method, SAA, either captured by the antibodies coating the test strips or marked by the conjugate antibodies, accumulates in the wells. After the test strips were washed to eliminate unbound material, a tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution was added. The resulting colour change was assessed spectrophotometrically by means of comparison with the SAA concentration in the reference samples.

Measurement of Haptoglobin Levels

Haptoglobin levels were measured spectrophotometrically using a haptoglobin assay kit (Tridelta Development Limited, Ireland). At low pH levels, free Hb is inhibited and displays peroxidase activity. Haptoglobin appears in samples combined with haemoglobin. The peroxidase activity measured is directly proportionate to the level of Hb in the sample.

Measurement of Ceruloplasmin Levels

Ceruloplasmin levels were also measured spectrophotometrically, at a pH level of 5.6 and at a wavelength of 546 nm, using the “*p*-phenylenediamine oxidase activity method” described by Richterich and Colombo.

Statistical Analysis

The data obtained in the present study were statistically analysed with the independent samples

test (t-test), using the SPSS 20.0 software package. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

The sick animals included in the study showed clinical signs of severe pruritus, hair loss, skin scaling, crusting, and hyperkeratosis. The lesions were mainly localised to skin regions with less hair, but were also observed in other parts of the body.

The parasitological examination of the skin scrapings taken from the sick animals revealed the presence of *Sarcoptes canis* mites.

The SAA and Hp levels measured by biochemical analyses were found to significantly differ between the sick and healthy animals ($P < 0.001$). Furthermore, statistical comparison showed that the serum Cp levels of the sick and healthy animals also significantly differed from each other ($P < 0.05$). The SAA, Hp and Cp levels of the sick and healthy animals are presented in Table 1.

Table 1: The serum Hp, SAA and Cp levels of the sick and healthy dogs.

Tablo 1: Hasta ve sağlıklı köpeklerin serum Hp, SAA ve Cp seviyeleri.

Parameters	Patient X±SE (n=25)	Control X±SE (n=10)	P Values
Hp (g/L)	2.74±0.12	1.83±0.04	P<0.001
SAA (µg/mL)	18.11±0.84	5.8±0.71	P<0.001
Cp (mg/dL)	8.53±0.54	6.48±0.5	P<0.05

Hp: haptoglobin, SAA: serum amyloid-A, Cp: seruloplazmin.

DISCUSSION and CONCLUSION

Skin diseases are very common in pet animals and the most frequently observed skin disease of dogs is mange (1,2,17). Sarcoptic mange is a major skin disease characterized by severe pruritus, and is highly prevalent in Turkey and across the world. This disease occurs in several mammalian species, including humans, with no age, sex or breed predisposition (2,4). Sarcoptic mange is caused by mites, but predisposing factors are also highly influential on the occurrence of the disease (2). The most common skin disease of dogs is mange, and the

majority of cases are caused by the mite *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (5). In the present study, all of the sick dogs were determined to be infested with *Sarcoptes canis*.

In dogs, sarcoptic mites mostly infest sites with less hair, such as the ventral abdomen and the medial surface of the legs. However, these mites may also be localised to the periocular skin, pinna, elbows and their medial surface, and cause miliary dermatitis and intense pruritus (2,4,5,18). At the early stage of infestation, the skin of the affected area presents with erythema and the formation of tubercles and vesicles. As the disease progresses, scaling and crusting occur, together with the formation of skin folds (4,18). Chronic cases may present with seborrheic miliary dermatitis and lymphadenopathy (1,2,4). In agreement with literature reports, the sick animals included in this study presented with severe pruritus, hair loss, scaling, crusting, tubercle formation and hyperkeratosis.

Haptoglobin is an APP, which is synthesized by the parenchymal cells of the liver and freely circulates in the blood. Its levels start to increase approximately 8 hours after the development of inflammation (2,10). Haptoglobin is also synthesized locally, and shows major antioxidant/antimicrobial activity in the alveolar fluid and on mucosal surfaces. Owing to these features, haptoglobin is involved in the repair of tissue damage and protection against infections. The plasma levels of haptoglobin increase with inflammation, tissue damage and malignant proliferation, and decrease in the event of haemolysis and severe hepatocellular damage. Thus, the measurement of plasma Hp concentrations is very important both for diagnosis and the evaluation of the success of treatment (12). In the present study, higher serum Hp levels having been detected in the sick animals, when compared to the healthy controls, suggests that despite inflammation being local in the scabies cases investigated, a systemic effect may have occurred.

Serum amyloid-A is composed of two apolipoproteins, namely, A-SAA and C-SAA. Of these,

A-SAA increases with inflammatory processes. On the other hand, C-SAA concentrations undergo minimum alteration during the APR. The main site of production of SAA is the liver, yet extrahepatic synthesis also takes place (13,19). In the event of inflammatory processes, SAA is synthesized in the liver (14). SAA is made use of in the differentiation of inflammatory and non-inflammatory conditions as well as in the monitoring of diseases and the evaluation of the success of the treatment applied (9).

Significantly elevated levels of SAA are detected in bacterial and viral infections. In human medicine, SAA levels are measured to detect inflammatory activity and the extensity of inflammation, to monitor the prognosis of diseases, and to evaluate the efficiency of the treatment applied (13). Rahman et al. (20) reported a ten-fold increase in the SAA levels of Alpine mountain goats with sarcoptic mange. Similarly, in the present study, it was determined that SAA levels had increased in the sick dogs, as a result of the inflammation caused by an ectoparasitic disease.

Ceruloplasmin is an APP, which is mainly responsible for carrying copper in the blood plasma. It is synthesized in the liver and in extrahepatic regions, including the pulmonary epithelium (11,15,16). Owing to its role in the plasma transport of copper, ceruloplasmin can be used for the diagnosis of diseases that affect plasma copper transport. Ceruloplasmin enables the oxidation of toxic Fe²⁺ into non-toxic Fe³⁺, and thereby protects tissues against free radical-induced damage (15). Furthermore, as it aids in the elimination of superoxide and reactive oxygen, it also shows antioxidant activity (9,15,16,21). The results of the present study revealed that the serum Cp levels of the sick animals were higher than those of the healthy control animals, and thereby, demonstrated that inflammatory damage had occurred in the infested dogs.

In conclusion, the serum Hp, SAA and Cp levels of the dogs infested with *Sarcoptes canis* were

determined to be higher than the levels of the healthy dogs, and this difference was found to be statistically significant. Accordingly, the levels of these APPs, which are generally used as inflammatory indicators, having been detected to be higher in mangy dogs with local skin damage suggested that these parameters could also be used as inflammatory indicators in mange cases.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aydın L., 2013. Akar enfestasyonları (uyuz). In "Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları", Ed., MA Özcel, 1310-1316, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornaova, İzmir.
- Paksoy N., Kırmızıgül AH., Özçelik M., Taşçı GT., Erkiş EE., 2014. Köpeklerde doğal *Sarcoptes canis* enfestasyonunda serum bakır ve çinko değerlerindeki değişiklikler. Atatürk Üniv Vet Bil Derg, 9, 46-49.
- Or ME., Bakirel U., Tuncel H., Arun S., Karakoç Y., Dodurka HT., Barutçu ÜB., 2002. Deri hastalıklı köpeklerde serum çinko ve bakır düzeyleri ile histopatolojik değişikliklerin ilişkisi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg, 28, 337-345.
- Aktaş MS., 2010. Kedi ve köpeklerde paraziter deri hastalıkları. Türkiye Klinikleri J Vet, 1, 131-142.
- Çakmak F., 2015. Köpeklerde kaşıntının etiyojisi. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 1, 1-8.
- Nwufoh OC., Sadiq NA., Emikpe BO., 2019. Clinicopathological and mineral changes associated with dogs infested with *Sarcoptes scabiei* var. *canis*. Comp Clin Pathol, 28, 1037-1044.
- Ranjith Kumar M., Selvaraj P., Venkatesan M., 2018. Atypical *Sarcoptes scabiei* infection in an adult Labrador retriever. J Entomol Zool Stud, 6, 92-94.
- Milanovic Z., Vekic J., Radonjic V., Bozovic Al., Zeljkovic A., Janac J., Spasojevic-Kalimanovska V., Buch J., Chandrashekar R., Bojic-Trbojevic Z., Hajdukovic L., Christopher MM., Kovacevic Filipovic M., 2018. Association of acute *Babesia canis* infection and serum lipid, lipoprotein, and apoprotein concentrations in dogs. J Vet Intern Med, 33, 1686-1694.
- Gökçe Hİ., Bozukluhan K., 2009. Çiftlik hayvanlarında önemli akut faz proteinleri ve bunların veteriner hekimlik alanındaki kullanımı. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 1, 1-14.
- Karaca M., Akgül Y., 2006. Köpeklerin karaciğer toksikasyonlarında akut faz proteinleri (Haptoglobin, Seruloplazmin ve Fibrinojen) ve lipit peroksidasyonunun (Malondialdehit ve redükte Glutatyon) tanısai önemi. Yüzüncü Yıl Üniv Sağlık Bil Derg, 9, 203-217.
- Sevgisunar NS., Şahinduran Ş., 2014. Hayvanlarda akut faz proteinleri, kullanım amaçları ve klinik önemi. MAKÜ Sağ Bil Enst Derg, 2, 50-72.
- Dobryszczycka W., 1997. Biological functions of haptoglobin. Eur J Clin Biochem, 35, 647-654.
- Batirel A., Gençer S., Özer S., 2003. Enfeksiyon göstergesi olarak akut faz reaktanları: C-reaktif preotein (CRP) ve serum amiloid A (SAA). Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Derg, 3, 220-224.
- Petersen HH., Nielsen JP., Heegaard PMH., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet Res, 35, 163-187.
- Tuna GE., Ulutaş B., 2015. Hastalıkların biyobelirteçleri olarak akut faz proteinleri. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Intern Med-Special Topics, 1, 8-19.
- Ulutaş PA., Ulutaş B., Sarierler M., Bayramlı G., 2007. Serum haptoglobin and ceruloplasmin concentrations in dogs with various diseases. İstanbul Üniv Vet Fak Derg, 33, 35-42.
- Çakmak A., Vatansever Z., 1997. Hayvanlarda uyuz hastalığı. "Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler", Ed., MA Özcel, N

- Daldal, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 13, 317-339.
18. İmren HY., Şahal M., 1994. "Veteriner İç Hastalıkları", 208-209, 3. Baskı. Medisan Yayın Evi, Ankara.
 19. Coetzee GA., Strachan AF., van der Westhuyzen DR., Hoppe HC., Jeenah MS., Beer FC., 1986. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. J Biol Chem, 261, 9644-9651.
 20. Rahman MM., Lecchi C., Fraquelli C., Sartorelli P., Ceciliani F., 2010. Acute phase protein response in Alpine ibex with sarcoptic mange. Vet Parasitol, 25, 293-298.
 21. Tothova C., Nagy O., Kovac G., 2014. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. Veterinarni Medicina, 59, 163-180.



Prevalence of Foot Lesions Among the Slaughtered Cattle in the Northwest of Iran*

Farid MAHD-GHAREHBAGH^{1a}, Siamak KAZEMI-DARABADI^{2b}✉, Hamid AKBARI^{2c}

1. University of Tabriz, Faculty of Veterinary Medicine, Graduated of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Tabriz, IRAN.
2. University of Tabriz, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Tabriz, IRAN.
ORCID: 0000-0001-68781542^a, 0000-0003-3219-6071^b, 0000-0002-1001-0312^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
29.10.2019	10.01.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Mahd-Gharehbagh F, Kazemi-Darabadi S, Akbari H: Prevalence of Foot Lesions Among The Slaughtered Cattle in The Northwest of Iran. *Atatürk University J. Vet. Sci.*, 15(1): 7-13, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.639470

Abstract: The objective of this study was to determine the prevalence of foot lesions in cattle slaughtered in the northwest of Iran. This study was performed on lower limbs of slaughtered cattle in four seasons of 2018-19. The feet of 400 cattle were divided into various zones to differentiate the lesions. The associations between gender and season with the lesions were assessed using the chi-square method and the results were presented as a percentage. $P < 0.05$ was considered significant. The association between gender and season with the lesions was statistically significant ($P < 0.01$). Lesions were observed in 61.5% of cattle and 78.5% of them were male. The lesions were more prevalent in autumn and winter (35.4%). 27% of total lesions were related to the forelimbs and 73% of them were related to the hindlimbs. Double sole and subclinical laminitis were the most frequent lesions of the limbs followed by sole, toe, and heel ulcers, white line disease, hoof cracks, interdigital hyperplasia, and interdigital necrobacillosis. Since a high percentage of slaughtered cattle in northwest Iran had at least one lesion in their feet, especially in the autumn and winter, it seems that proper management of herds is necessary to eliminate predisposing factors and improve livestock health.

Keywords: Cattle, Foot Lesions, Hoof, Iran, Prevalence.

İran'ın Kuzeybatısında Kesilen Büyükbaş Hayvanlarda Ayak Lezyonlarının Görülme Sıklığı

Öz: Bu çalışmanın amacı İran'ın kuzeybatısında kesilen sığırlarda ayak lezyonlarının yaygınlığını belirlemektir. Bu çalışma 2018-19 dört mevsiminde kesilmiş sığırların alt ekstremitelerinde gerçekleştirildi. 400 büyükbaş hayvanın ayakları lezyonları ayırt etmek için çeşitli bölgelere ayrıldı. Lezyonlarla cinsiyet ve mevsim arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile değerlendirildi ve sonuçlar yüzde olarak sunuldu. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Lezyonlarla cinsiyet ve mevsim arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.01$). Sığırların %61.5'inde lezyonlar gözlemlendi ve %78.5'i erkekti. Lezyonlar sonbahar ve kış aylarında daha sıkı (%35.4). Toplam lezyonların %27'si ön ayaklar, %73'ü arka ayaklar ile ilişkiliydi. Ekstremitelerde en sık görülen lezyonlar çift taban ve subklinik laminit olup bunu taban, ayak ve ökçe ülserleri, beyaz çizgi hastalığı, toynak çatlakları, interdigital hiperplazi ve interdigital nekrobasiloz izledi. Kuzeybatı İran'da kesilen sığırların yüksek bir yüzdesi özellikle sonbahar ve kış aylarında ayaklarında en az bir lezyon bulundurdıklarından, predispozan faktörleri ortadan kaldırmak ve hayvan sağlığını iyileştirmek için sürülerin uygun şekilde yönetilmesi gerektiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ayak Lezyonları, İran, Prevalans, Sığır, Tırnak.

✉ Siamak Kazemi-Darabadi

University of Tabriz, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Tabriz, IRAN.
e-mail: s.kazemi@tabrizu.ac.ir

*This research is derived from the DVM thesis of the first author.

INTRODUCTION

Lameness is an important cause of economic losses and a primary cause of reduced animal welfare in both beef and dairy herds is of crucial concern to bovine herd health (1). It causes the third-largest economic losses in the dairy cattle industry following mastitis and reproductive disorders. However, due to the impact of lameness on production and reproduction, some researchers consider it as the most important factor in damaging dairy herds today. The economic losses due to lameness in the UK were estimated to be £ 90 million a year (2). Approximately 90% of lameness incidents in cattle are related to digital lesions (3).

Information on the prevalence of lameness and limb injuries in North American and European dairy herds has been collected in recent decades and efforts have been made to find solutions to reduce these diseases. Its prevalence at the herd level was reported to be 43.5% in a Brazilian state, 9% in Canada, and 18% in France, Germany, Spain, and Sweden (4-6). Several studies have also been conducted to estimate the prevalence of lameness in various regions of Iran. The results of Azizi-Mahmoudjig and coworkers' study (7) demonstrated that 14.7% of heifers and cows in semi-industrial and 3.4% of them in industrial herds of Urmia suffer from lameness. Mohammadnia et al. (8) found that 55.14% of studied dairy cows in Shahrekord are lame based on locomotion scoring. Another study in dairy herds of Shahrekord showed that 48.6% and 40.17% of affected digits are in autumn and spring, respectively (9).

Determining the frequency of foot lesions in each geographical area may play an effective role in planning the prevention and treatment of these problems because there are obvious differences in the estimated prevalence of digit lesions in different countries. There are several known factors affecting the occurrence of the lesions such as type of housing, weather, production rate, nutrition, individual

factors, as well as the presence of pathogenic organisms in the area, leading to a big variation in the prevalence of diseases reported in the literature (10). For instance, in the case of housing conditions, daily access of the majority of the cattle (89%) to pasture in the Netherlands was associated with a reduced prevalence of hoof lesions (11). Cattle, which had access to thick bedding of straw, have also shown the least amount of digit lesions (12). However, to our knowledge, there is no data available concerning the prevalence of hoof lesions in culled cattle or herds of the northwest of Iran. Mostly traditional loose-housing system with the cold and humid climate in this area led us to assume that number of affected cattle may be increased. Thus, the purpose of this study was to determine the prevalence of foot lesions in culled cattle in the northwest of Iran during a whole year.

MATERIALS and METHODS

Animals

This study was done in the cattle slaughtered at the Tabriz and Urmia Industrial Slaughterhouses, located in Azarbaijan provinces of Iran, in spring, summer, and autumn of 2018 and winter of 2019. Approval of the ethics committee was not required because of the use of slaughtered animals. Attending times were randomly selected so that the abattoirs were visited four times in each season to examine the limbs of the cattle. Sex and approximate weight were recorded before slaughter.

The sample size was determined using the Cochran's sample size formula with a 95% confidence interval. The population size was estimated 30,000 based on the national statistical reports (13). Regarding the number of cattle slaughtered in the province, the sample size of 380 was calculated. So, the total number of 400 cattle was examined in this study to estimate the prevalence of digit lesions in the region.

Detection of the lesions

On each sample collecting day, the feet of each cattle were collected and washed to check for lesions. Since the feet of each cattle after slaughtering were delivered together, we had to detect that each foot belongs to hindlimbs or forelimbs. The forelimbs and hindlimbs were distinguished based on the oval shape of the metacarpus and circular shape of the metatarsus bones, as well as the relative size of the proximal and middle phalanges which are reported to be shorter in the hindlimbs than forelimbs (3). After the foot was fixed on the special clamp and the primary hoof trimming was done, the lesions were recorded and photographed. Then, the hoof horn was removed from the underlying tissues after placing the limb in boiling water, to determine the extent of lesion penetration to the underlying tissues.

To easier differentiate the lesions, the sole and hoof wall were hypothetically subdivided into different zones (Figure 1), and the following lesions were traced (14): double sole (zones 3, 4, 5, and 6), subclinical laminitis (zones 1-6), white line disease (zones 1, 2 and 3), toe ulcer (zones 1 and 5), sole ulcer (zone 4), heel ulcer and erosion (zone 6), horizontal and vertical cracks and hoof fractures (zones 7, 8, 11 and 12), interdigital necrobacillosis, dermatitis and hyperplasia (zone 0) with extensive lesions of digital dermatitis (zone 10).

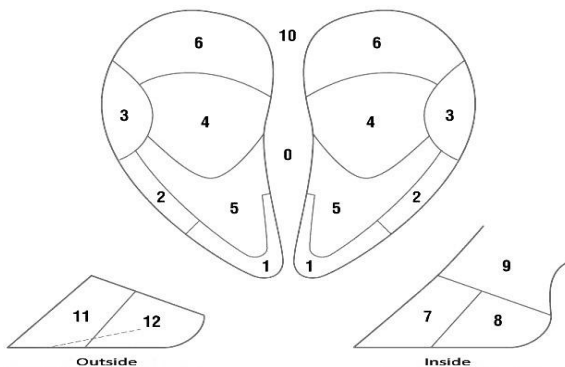


Figure 1. Subdividing the solar surface, interdigital space, and axial and abaxial hoof wall of the cattle into various zones to help trace different lesions.

Şekil 1. Farklı lezyonları izlemeye yardımcı olmak için sığırların axial ve abaxial tırnak duvarı, interdigital boşluk ve taban yüzeyinin çeşitli bölgelere ayrılması.

Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics for Windows (Version 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for statistical analysis. Hoof lesions data and their types were reported as descriptive statistics and percentages. The effects of gender and season on the lesions were evaluated using the chi-square method and the results were presented as percentages. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Totally, 400 cattle (67 females and 333 males) with the average weight of 325 ± 42 kg were examined during the four seasons. Lesions were observed in 61.5% of the animals and 38.5% of them were healthy. There was a significant difference between healthy and affected animals percentage ($P = 0.001$). Among the affecteds, 78.5% were male and 21.5% female. In addition, 79.1% of all females and 58% of all males had lesions. In terms of the prevalence of lesions in different seasons, 17.1% were in spring, 12.1% in summer, 35.4% in autumn and 35.4% in winter (Table 1). The differences between healthy and affected animals in each season was also significant ($P = 0.001$). Of the total lesions, 27% were in the forelimbs and 73% were in the hindlimbs.

Double sole (28.5%) and subclinical laminitis (23.5%) were the most prevalent diseases followed by sole ulcer (13%), toe ulcer (9.3%), heel ulcer (7.7%), white line disease (7.75%), hoof fracture (5.75%), and interdigital hyperplasia (2.1%). Interdigital necrobacillosis (0.8%), horizontal crack (0.8%), and vertical crack (0.8%) were the lowest lesions identified (Figure 2). Some of these lesions are shown in Figure 3.

Table 1. The number and percentage of healthy and affected cattle based on gender and season in culled cattle in northwest Iran.

Tablo 1. İran'ın kuzeybatısında kesilen sığırlarda, cinsiyete ve mevsime göre sağlıklı ve etkilenen sığırların sayısı ve yüzdesi.

Categorical variables		Hoof status				Total	P-value
		Affected		Healthy			
		No. (% in affected)	% in category	No. (% in healthy)	% in category		
Gender	Female	53 (21.5)	79.1	14 (9.1)	20.9	67	0.001
	Male	193 (78.5)	58	140 (90.9)	42	333	
	Spring	42 (17.1)	60.9	27 (17.5)	39.1	69	
Season	Summer	30 (12.2)	36.6	52 (33.8)	63.4	82	0.001
	Autumn	87 (35.4)	72.5	33 (21.4)	27.5	120	
	Winter	87 (35.4)	67.4	42 (27.3)	32.6	129	
Total		246	38.5	154	61.5	400	

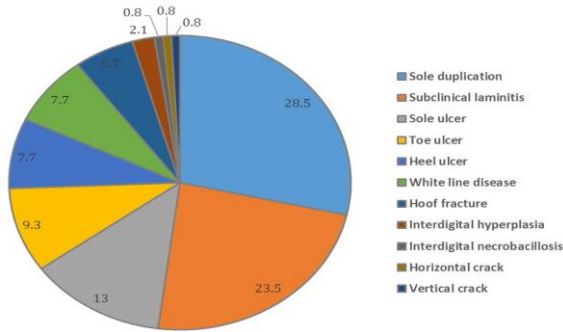


Figure 2. The contribution of each lesion to the total number of detected foot lesions (%) in culled cattle in northwest Iran.

Şekil 2. İran'ın kuzeybatısındaki kesilen sığırlarda her bir lezyonun tespit edilen toplam ayak lezyonu sayısına (%) katkısı.

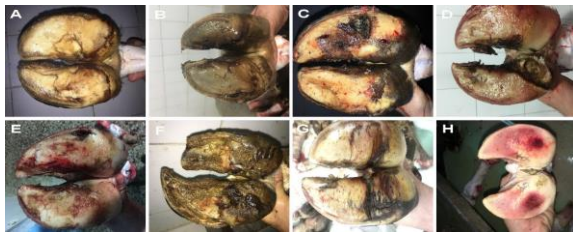


Figure 3. Detected lesions in cattle hooves. A. duplicate sole, B. subclinical laminitis, C. sole ulcer, D. heel ulcer, E. white line disease, F. hoof fracture, G. interdigital hyperplasia, H. interdigital necrobacillosis along with sole ulcer.

Şekil 3. Sığır tırnaklarında tespit edilen lezyonlar. A. çift taban, B. subklinik laminit, C. taban ülseri, D. ökçe ülseri, E. beyaz çizgi hastalığı, F. tırnak kırığı, G. interdigital hiperplazi, H. taban ülseri ve interdigital nekrobasiloz.

DISCUSSION and CONCLUSION

This study was performed on hoof and digit lesions of slaughtered cattle. Our findings showed that 61.5% of the cattle examined had at least one lesion in their feet, which is much higher than that of the results of a similar study in the neighbour province, Ardabil, reporting 24.2% of slaughtered cases had hoof lesions (15). Given that in the surveyed geographical area, cattle are usually culled if keeping them is not justified because of low milk yield or lameness, it is likely that the prevalence of lameness in the livestock population of the area is less than our finding. It has been previously reported that lameness should be considered as an important factor for the culling of Iranian dairy cows (16). The reason for the higher incidence of lesions in cows than bulls in our study may be the fact that the cows slaughtered at the end of their economic period of life; while bulls and steers are slaughtered at a relatively younger age. For instance, the mean age of slaughtered cows in Switzerland is 5.6 years, while the number of slaughtered bulls in this age range is much lower (17). Although among the affected cattle, 78.5% were male and 21.5% female, this does not indicate a high incidence of lesions in males compared to females; instead this is because the total number of slaughter males was greater than female cows.

In this study, lesions were higher in autumn and winter seasons so that 35.4% of total lesions were observed in both seasons and the lowest amount of lesions was observed in summer. This finding is in contrary to the results of Madadzadeh and coworkers (15) who observed a higher incidence of lesions in Ardabil in summer. Lack of access to the pasture increases risk of hoof problems (18). Because cattle housing is a combination of traditional and industrial systems in the region (19), it is difficult to attribute the lesions to lack of access to the pasture in the winter. Cattle are brought to the pasture in the traditional systems in the warm seasons, but they are housed indoors in industrial systems throughout the year. So, although the lower rate of lesions in the warm seasons may be partly attributable to the access of some cattle to the pasture, it seems most likely that the high prevalence of lesions in wet seasons is due to poor hygiene and high humidity. According to the report of Azizi Mahmoudjigh et al. (7), 69% of lesions in Urmia were related to hindlimbs which were almost twice the lesions of the forelimbs. In this study, the rate of lesions in the hindlimbs was almost three times that of the forelimbs, accounting for 73% of total lesions. The high prevalence of lesions in the hindlimbs seems to be due to the greater weight-bearing of the cattle on their hindlimbs compared to the forelimbs. Most bodyweight is tolerated by the hindlimbs, especially in the pregnancy period (7).

Mohammadnia and coworkers (9) found that double sole counts for 14.49% of hoof lesions in dairy herds of Shahrekord during autumn. In our study, double sole was 28.5% of the identified lesions and was the most common problem of the limbs indicating lack of proper and regular hoof trimming in the herds. Subclinical laminitis accounted for 23.5% of the detected lesions in this study. In this form of laminitis, haemorrhages in the sole horn, yellow discolouration, softening of the sole horn, or sole ulcers may develop (20). Since high concentrate intake and limited roughage intake increase the risk of subclinical laminitis (21), this high prevalence reveals the necessity of proper nutritional

management of cattle in the area. The sole ulcer is one of the most severe pathologies causing lameness and is associated with impaired milk yield (22). A herd-level study at the vicinity of Tehran concluded that 55% of feet with thin soles had lesions such as sole haemorrhage. Concrete surface, commingling of animals with different ages and prolonged water contact of the hoof horn are aggravating factors (23). In another study, Nouri and coworkers found that toe ulcer, sole ulcer, and heel ulcer account for 6.9%, 20.9%, and 13.9% of hoof lesions in an abattoir near Tehran, respectively (24). Our findings also showed 13% sole ulcers, 9.3% toe ulcers, and 7.7% heel ulcers.

Researchers have emphasised the relationship between the grooved concrete floor and the increase in white line disease. Cattle that are in the pasture during the day and are housed in the stall at night are also at greater risk of developing the lesion than those are in the pasture all the time (25); therefore, it seems that this factor, as well as the inappropriate floor of the stalls, caused 7.75% of white line disease in this study. Although, the prevalence of this lesion in a similar study in Ardabil was higher (25.1%) than our findings, which may also be related to the differences in moisture (15).

In our study, hoof fractures accounted for 5.75% of the lesions, which is relatively high, but still much lower than the results of a study in Ethiopia with 40% of the hoof fracture rate (26), pointing out the necessity of preventing excessive hoof growth as well as preventing trauma to the hoof. Interdigital hyperplasia or wart has the highest estimate of heredity in a research on hereditary limb lesions in dairy herds of California (27) and the prevalence of this lesion in beef cattle referred to the Auburn University Large Animal Hospital in the United States was determined to be 15.8% (1). Despite the lesion was affected a smaller percentage of cattle in our study, it is necessary to take measures to eliminate it. Interdigital necrobacillosis is caused by trauma as well as the presence of a muddy, moisture bedding, and may eventually lead to reduced milk yield and culling of cattle. *Fusobacterium necrophorum* is the

main known pathogen to cause this disease. The disease is sporadic, with a prevalence rate of 0.2 to 5% in North America (28), which is similar to that observed in this study (0.8%). Horizontal and vertical cracks were accounted for 0.8% of lesions. Horizontal cracks are associated with changing winter nutrition to spring lush grass or in response to climatic conditions. These cracks represent a stressful event in the past (29). The prevalence of vertical cracks in a dairy farm of Nazarabad, Iran was 3.2% (30). Trauma, diet, dehydration and low environmental humidity affects the mechanical properties of horn tissue and increases the fragility of the dorsal wall horn (7); therefore, changes in diet and environmental moisture may contribute to these lesions in the studied cattle.

In conclusion, the results of this study showed that a high percentage of culled cattle in northwest Iran have at least one type of digit lesions and these lesions are more prevalent in autumn and winter seasons. Since limb problems and lameness are important factors in reducing production, which causes economic losses to the herd, more attention should be paid to the management conditions of herds in the region to eliminate predisposing factors and the possibility to increase the bovine digital health.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the administrations and staff of the Tabriz and Urmia Industrial Slaughterhouses.

REFERENCES

1. Newcomer BW., Chamorro MF., 2016. Distribution of lameness lesions in beef cattle: A retrospective analysis of 745 cases. *Can Vet J*, 57, 401-406.
2. Ozsvari L., 2017. Economic cost of lameness in dairy cattle herds. *J Dairy Vet Anim Res*, 6, 00176.
3. Gündemir O., Özkan E., Mutuş R., 2020. Morphometric study on the digital bones in the domestic cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 26, 75-82.
4. Costa JH., Burnett TA., von Keyserlingk MA., Hötzel MJ., 2018. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: effects of housing systems. *J Dairy Sci*, 101, 2395-2405.
5. Cutler JH., Rushen J., de Passille AM., Gibbons J., Orsel K., Pajor E., Barkema HW., Solano L., Pellerin D., Haley D., Vasseur E., 2017. Producer estimates of prevalence and perceived importance of lameness in dairy herds with tiestalls, freestalls, and automated milking systems. *J Dairy Sci*, 100, 9871-9880.
6. Sjöström K., Fall N., Blanco-Penedo I., Duval JE., Krieger M., Emanuelson U., 2018. Lameness prevalence and risk factors in organic dairy herds in four European countries. *Livest Sci*, 208, 44-50.
7. Azizi Mahmoudjig S., Dalir Naghadeh B., Ahmadian K., 2005. Clinical study of lameness associated with digital diseases in dairy cows in Urmia. *J Fac Vet Med Univ Tehran*, 60, 241-246.
8. Mohamadnia AR., Mohamaddoust M., Shams N., Kheir, S., Sharifi S., 2008. Study on the prevalence of dairy cattle lameness and its effects of production indices in Iran. A locomotion scoring base study. *Pak J Biol Sci*, 11, 1047-1050.
9. Mohammadnia AR., Kheiri S., Mohammaddoust M., Kabiri J., 2007. Study on distribution of dairy cattle hoof lesions and its relation to locomotion scoring. *Iran J Vet Surg*, 2, 22-30.
10. Clarkson MJ., Downham DY., Faull WB., Hughes JW., Manson FJ., Merrit JD., Murray RD., Russell WB., Sutherst JE., Ward WR., 1993. An epidemiological study to determine the risk factors of lameness in dairy cows. The Liverpool Report of the UK Ministry of Agriculture,

- Fisheries and Food.
11. Sogstad AM., Fjelddas T., Osteras O., Forshell KP., 2005. Prevalence of claw lesions in Norwegian dairy cattle housed in tie stalls and free stalls. *Prev Vet Med*, 70, 191-209.
 12. Somers JGCJ., Frankena K., Noordhuizen-Stassen EN., Metz JHM., 2003. Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cows exposed to several floor systems. *J Dairy Sci*, 86, 2082-2093.
 13. Statistical Center of Iran, 2016. Statistics of animal slaughter in slaughterhouses of the country, Tehran, Statistical Center of Iran.
 14. Solano L., Barkema HW., Mason S., Pajor EA., Leblanc SJ., Orsel K., 2016. Prevalence and distribution of foot lesions in dairy cattle in Alberta, Canada. *J Dairy Sci*, 99, 6828-6841.
 15. Madadzadeh T., Nouri M., Noweouzian I., 2013. Breed and season effects on the claw lesions of dairy cows in Ardebil, Iran. *Anim Vet Sci*, 1, 46-50.
 16. Bahonar A., Sharifi H., Bokaie S., Vodjgani M., Rahimi Foroushani A., Haghdoost AA., 2009. Modeling the effect of lameness on culling of dairy cows in Tehran Province. *Iran J Vet Surg*, 4, 37-44.
 17. Vial F., Scharrer S., Reist M., 2015. Risk factors for whole carcass condemnations in the Swiss slaughter cattle population. *PLoS One*, 10, e0122717.
 18. Mandel R., Whay HR., Klement E., Nicol CJ., 2016. Invited review: Environmental enrichment of dairy cows and calves in indoor housing. *J Dairy Sci*, 99, 1695-1715.
 19. Vagef R., Mahmoudi R., 2013. Occurrence of Aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk produced in west region of Iran (during summer and winter). *Int Food Res J*, 20, 1421-1425.
 20. Wilhelm K., Wilhelm J., Füll M., 2015. Use of thermography to monitor sole haemorrhages and temperature distribution over the claws of dairy cattle. *Vet Rec*, 176, 146.
 21. Pilachai R., Schonewille JT., Thamrongyoswittayakul C., Aiumlamai S., Wachirapakorn C., Everts H., Hendriks WH., 2013. Diet factors and subclinical laminitis score in lactating cows of smallholder dairy farms in Thailand. *Livest Sci*, 155, 197-204.
 22. O'Driscoll K., McCabe M., Earley B., 2015. Differences in leukocyte profile, gene expression, and metabolite status of dairy cows with or without sole ulcers. *J Dairy Sci*, 98, 1685-1695.
 23. Nowrouzian I., Nouri M., 2009. Thin sole as a cause of sole hemorrhages: Study on a herd level. *Vet Res Pajouhesh va Sazandegi*, 82, 31-37.
 24. Nouri M., Nowrouzian I., Vajhi A., Marjanmehr SH., Faskhoudi D., 2011. Morphometric radiographic findings of the digital region in culling lame cows. *Asian J Anim Sci*, 5, 256-267.
 25. Barker ZE., Amory JR., Wright JL., Mason SA., Blowey RW., Green LE., 2009. Risk factors for increased rates of sole ulcers, white line disease, and digital dermatitis in dairy cattle from twenty-seven farms in England and Wales. *J Dairy Sci*, 92, 1971-1978.
 26. Sulayeman M., Fromsa A., 2012. Lameness in dairy cattle: Prevalence, risk factors and impact on milk production. *Glob Vet*, 8, 1-7.
 27. Oberbauer AM., Berry SL., Belanger JM., McGoldrick RM., Pinos-Rodriguez JM., Famula TR., 2013. Determining the heritable component of dairy cattle foot lesions. *J Dairy Sci*, 96, 605-613.
 28. Kontturi M., Kujala M., Junni R., Malinen E., Seuna E., Pelkonen S., Soveri T., Simojoki H., 2017. Survey of interdigital phlegmon outbreaks and their risk factors in free stall dairy herds in Finland. *Acta Vet Scand*, 59, 46.
 29. Greenough PR., 2001. Sand cracks, horizontal fissures, and other conditions affecting the wall of the bovine claw. *Vet Clin N Am-Food A*, 17, 93-110.
 30. Nouri M., Ashrafi Helan J., 2012. Clinical and gross pathologic findings of complicated vertical fissures with digital dermatitis in a dairy herd. *Vet Res Forum*, 3, 291-295.



The Study of Histological Observations of Ovine Claw Coronary Region and the Architecture Morphology of Arterial Anastomosis of This Area

Ramzi Abdulghafoor Abood AL-AGELE^{1a}✉

1. University of Diyala, College of Veterinary Medicine, Department of Anatomy and Histology, Baqubah, IRAQ.
ORCID: 0000-0003-0699-3261^a

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
18.10.2019	16.02.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Al-Agele RAA, Ibrahim ZK: The Study of Histological Observations of Ovine Claw Coronary Region and The Architecture Morphology of Arterial Anastomosis of This Area. Atatürk University J. Vet. Sci., 15(1): 14-21, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.634782

Abstract: This study was carried out with the aim of assessing the importance of coronary region for providing a clear comprehensions study into the structure and function of coronary dermal papillae and their role in potentiality of adaptive variations. A total of 30 sheep claws were collected and tissue sections were extracted from the coronet. Following processing and embedding, tissues from each claw were cut and stained to visualize a number of histological aspects. The samples were also evaluated using cast form to detect the arterial blood supply. This study indicated the architecture distribution of blood anastomosis within the foot, where the main anastomosis of blood capillaries was in proximal, distal and caudal part of sheep foot. The presence of such complex arterial anastomosis in the blood vessels suggest that a greater blood flow capacity to the sheep feet. Histologically, the results showed that the coronary region of claw sheep had numerous perioplic and coronary dermis. The dermal papillae were distributed on the coronet region with average number 11/mm². The results indicated that average thickness of stratum basale and stratum spinosum was 202.4±3.3 µm, and average stratum corneum was 68.3±4.2 µm, while the whole epidermal tissue started from the basement membrane to the external surface was 270.8±2.5 µm. The data of the current study will be used as a reference literature to treat the pathologically affected sheep feet diseases.

Keywords: Blood Anastomosis, Cast Form, Claws Sheep, Coronary Region, Dermal Papillae.

Koyun Tırnak Koroner Bölgesinin Histolojik İncelemesi ve Arteriyel Anastomozunun Yapısal Morfolojisi

Öz: Bu çalışma, koroner dermal papillaların yapısı ve işlevi hakkında net bir kavrayış çalışması sağlamak için koroner bölgenin önemini ve adaptif varyasyonların potansiyelindeki rolünü değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Toplam 30 koyun ayak tabanı toplandı ve doku bölümleri tırnağın taç kısmından çıkarıldı. Doku takibi ve parafin blokajından sonra, kesitler alındı ve mikroskopik değerlendirmeler için H&E ile boyandı. Örnekler ayrıca arteriyel kan kaynağını tespit etmek için alçı form kullanılarak değerlendirildi. Bu çalışma, kan kılcal damarlarının ana anastomozunun koyun ayağının proksimal, distal ve kaudal kısımlarında olduğu gösterdi. Kan damarlarında bu gibi kompleks arteriyel anastomozların varlığı, koyun ayaklarına daha fazla kan akış kapasitesi olduğunu göstermektedir. Histolojik olarak, sonuçlar koyunlarda ayak tabanının koroner bölgesinin sayısız perioplik ve koroner dermise sahip olduğunu göstermiştir. Dermal papillanın, ortalama sayısı 11/mm² olduğu saptandı. Stratum basale ve stratum spinosum 202.4 ± 3.3 µm ve stratum korneum 68.3 ± 4.2 µm olarak ölçüldü. Tüm epidermal dokunun bazal membrandan dış yüzeye uzaklığı 270.8 ± 2.5 µm idi. Bu çalışmanın verileri, potansiyel olarak tedavi için yeni kanıtlar sağlayarak, patolojik olarak etkilenen koyun ayak hastalıklarında referans kaynak olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Alçı Formu, Dermal Papilla, Kan Anastomozu, Koroner Bölge, Koyun Ayak Tabanı.

INTRODUCTION

The distal extremity of odd-toed and/or even-toed ungulates is protected by a unique structural component called hoof/claw. This has various different segments; each of them has various rates of horn growth and abrasion with different function. (1,2). The external morphology of the hoof or claw wall is indirectly interrelated with the shape and function of the internal parts of the animal foot (3,4). Small ruminants are cloven-footed animals that means the hoof consists of two digits (3), rather than one compact entity similar to that of equine feet (5). These digits are equivalent to the third and fourth fingers of the human hand (6). In general, the claws are termed by their relative position on the animal foot. The claws/hooves have a highly complicated and anastomosis blood supply which is mainly originated from small branches of the dorsal tarsal/metatarsal arteries and common palmar/plantar digital arteries (7,8). In the rear limb, most of the digital arteries are formed from the small branches of common planter digital arteries (6). These digital arteries are extended at the level of second digit to provide blood supply to the coronet and further down to the heel bulbs (5), whereas, there are nearly up 8 to 10 small branches arising distally to supply blood to the sole margin. This morphoorganization of arterial blood supply in animal feet is a highly important in healthy feet, as it is a subtle alteration of the microvascular system in the coronary region could change the amount of keratinous tissue and this leads to change in the structural and functional components of the hoof wall (9). For instance, in equine hoof, it was found that any deffct in the capillary network of the terminal arch and the small arteries arising from it helped in the development of chronic laminitis and/or can be develop to cause decreases in the rates of horn growth. However, up to now, there has been very little published research regarding the importance of blood circulation on the ovine claw coronary region (9,10). The hoof or claw is deemed

as the most vital part for weight bearing and/or for movement (11). A comprehensive understanding of morphology of ovine claw coronary region would help in understanding the normal physiology of the conformation of sheep claw and further consequences of overgrowth rate, great wear or trimming claw horn in disease and/or healthy feet (12). It would as well contribute in understanding the role of claw horn in persistence and spread of infectious foot diseases (13,14). Therefore, this study was aimed to provide a complete and clear investigation of anatomical and histological observations of claw sheep coronary region, also to investigate the architecture morphology of such important part in sheep foot this would help to determine the causes, which result in the hoof deformities or possibly eliminate some causes to aid in future management plans.

MATERIALS and METHODS

Ethics Statement

This investigation was performed under the highly strict adherence to the main rules of care and the way of using domestic animals in research, teaching and experiment (15).

Experimental Animals

Sheep hooves were collected from the slaughterhouses one-hour post euthanasia following ethical approval by The College of Veterinary Medicine, University of Diyala. A total of 30 sheep hooves were divided into 20 of them were used for histological sampling and 10 for arterial cast form. Tissues samples of 6-7mm thickness were taken from the dorsal coronet as well as from the quarter regions both medial and lateral, and instantly fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours. Then all tissue samples were processed by routine methods, embedded in paraffin wax and then sectioned at 5 μ m and stained with routine staining (H&E).

Measurements of the epithelial thickness were calculated using calibrated a Fiji J software. Measurements of epidermal layers were performed on each image, measuring the space between basement membrane and cell keratinization, and the space between the basement membrane and the end of hoof wall. These measurements were recorded as mean \pm SEM using Excel software. Ten sheep hooves were collected for cast form of blood vessels, phosphate buffer saline (PBS) was injected via the medial and/or lateral palmar/plantar common digital arteries to evacuate blood vessels from the blood. Followed by injected with acrylic resin (self-curing repair powder and liquid containing Methyl methacrylate monomer, 4-dimethylamino toluene), extra pressure was applied to ensure the resin reached to fine blood capillaries. After that, all samples were left for 48 hours at 21 °C to reach full solidification, and then the samples were transferred for maceration as follow. Then, each sample was incubated in 40% potassium hydroxide for 72 hours to ensure digestion whole tissues (16). The soft tissue was completely macerated, so the cast was heavily contaminated with macerated tissue. Then the cast was washed with tap water. At the end, it was cleaned gently by washing with fine jet of syringe and then dried by air for examination and taking photograph using digital camera.

RESULTS

Cast form of blood vessels clearly showed the architecture distribution of blood anastomosis within the sheep foot. The main anastomosis of blood capillaries was observed in proximal, distal and caudal part of sheep foot as well as inside foot (Figure 1). The dorsal artery of the third phalanx appeared branches and anastomosis proximally forming coronary circumflex artery and distally circumflex artery of the sole, whereas the caudal surface appeared vascularized by arterial branches anastomose and nourished the coronet and extended further distally to nourish the digital

cushion of the heels (Figure 1). The sole of the heel part was observed vascularized by small arterial branches of terminal arch and sole margin arteries.

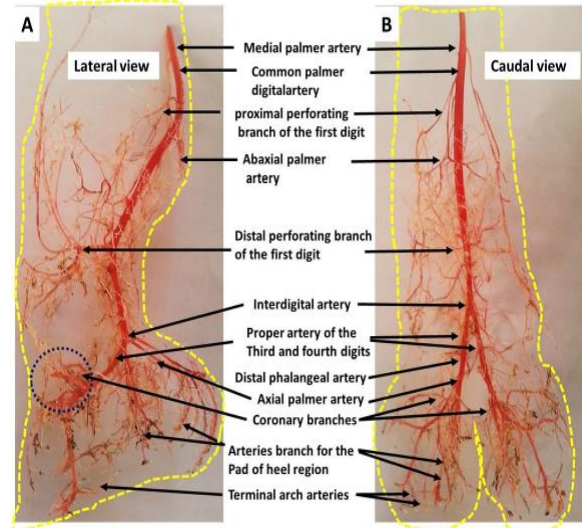


Figure 1. Photographs illustrating cast form of arterial blood supply of sheep foot. A) Shows lateral view of cast form. B) Illustrates distribution and the outlines of cast blood vessels on caudal view.

Şekil 1. Koyun ayağının arteriyel kan akışının döküm şeklini gösteren fotoğraflar. A) Döküm formunun yandan görünüşünü göstermektedir. B) Kaudal görünüm kan damarlarının dağılımını ve dökme ana hatlarını göstermektedir.

The results obtained from histological examinations revealed that the capsular wall had three distinct layers: stratum externum, stratum medium and stratum interum respectively. These findings showed that the stratum medium constituted the main bulk of the capsular wall and comprised from finger shape projections organized parallel and oriented vertically from the surface of interconnection between dermal and epidermal tissues of the coronet toward the ground surface (Figure 2). The dermal area of the periople and/or coronary regions showed to be formed from mesh dense matrix of connective tissue including nerves, arteries and veins, whereas the epidermal layer appeared to be comprised mostly from the stratified squamous keratinized epithelium and was observed continuous with the skin leg and appeared consisted from four expected layers (Figure 2).

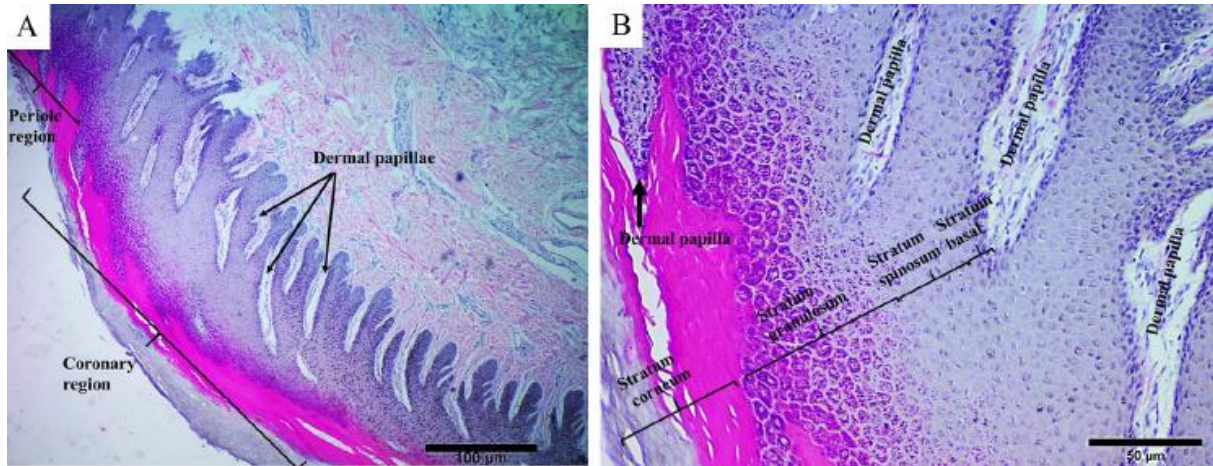


Figure 2. A) Photomicrograph image shows claw coronary region. B) Photomicrograph image shows the fourth layers of epidermal tissue of claw coronary region. These were appeared in the first layer (stratum basale), second layer (stratum spinosum), third layer (stratum granulosum) and fourth layer (stratum corneum). (H&E stain; (A) bar= 100 µm; (B) bar =50 µm).

Şekil 2. A) Fotomikrograf görüntüsü pençe koroner bölgesini göstermektedir. B) Fotomikrograf görüntüsü pençe koroner bölgesinin epidermal dokusunun dördüncü katmanlarını göstermektedir. Bunlar birinci tabakada (stratum basale), ikinci tabakada (stratum spinosum), üçüncü tabakada (stratum granulosum) ve dördüncü tabakada (stratum corneum) görüldü. (H&E stain; (A) bar= 100µm; (B) bar =50 µm).

The stratum basale was appeared as a thin deepest layer consisted from a double set of cuboidal to columnar cells, these cells were placed and arranged along the basement membrane. The long axis of their nucleus was observed directed at an acute angle to the keratinous layer (Figure 3). In addition, it was observed a black pigment of melanocytes (Figure 3) covered some of the basal cells. The second layer (stratum spinosum) was composed of numbers of polyhedral cells, these cells were appeared tightly adhered to each other and seemed to be more flattened toward the third and fourth external layer (stratum corneum). The third layer (stratum granulosum) was observed had granules in their cytoplasm and their nucleus ranged from oval to spherical shape, whereas the outermost layer (stratum corneum) was appeared as dead keratinocytes, which had either lost most or completely of the cells their nuclei toward the keratinous layer (Figure 3).

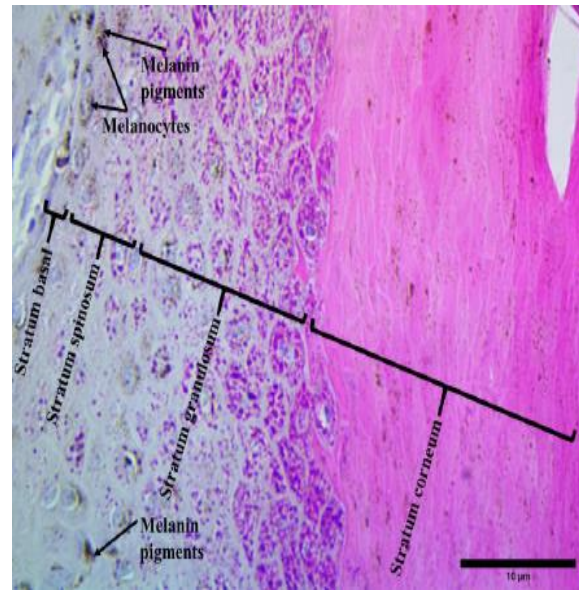


Figure 3. Photomicrograph image shows the fourth layers of epidermal tissue of claw coronary region at high magnification. Melanocytes were appeared at basal, spinosum and granulosum layers. (H&E stain; bar= 10 µm).

Şekil 3. Fotomikrograf görüntüsü yüksek büyütmede pençe koroner bölgesinin epidermal dokusunun dördüncü katmanlarını göstermektedir. Bazal, spinosum ve granulosum tabakalarında melanositler görüldü. (H&E stain; bar= 10 µm).

Measurements of the epithelial thickness were documented in (Table 1) and (Figure 4) as mean \pm SEM calculated for each sample. The results indicated that average stratum basale and stratum spinosum and granulosum was 202.4 \pm 3.3 μ m, and average stratum corneum was 68.3 \pm 4.2 μ m, while the whole epidermal tissue started from the basement membrane to the external surface was 270.8 \pm 2.5 μ m (Figure 4). Further analysis for the number of dermal papillae of coronary region on sheep claw revealed that the average number in the current study was found to be 11/mm² (Figure 4).

Table 1. Measurements of epithelial thickness at claw coronary region.

Tablo 1. Pençe koroner bölgesinde epitel kalınlığı ölçümleri.

Epidermal layers at claw coronary region	Epithelial thickness in μ m
Stratum basale, spinosum and granulosum	202.4 \pm 3.3
Stratum corneum	68.3 \pm 4.2
Whole epidermal tissue	270.8 \pm 2.5

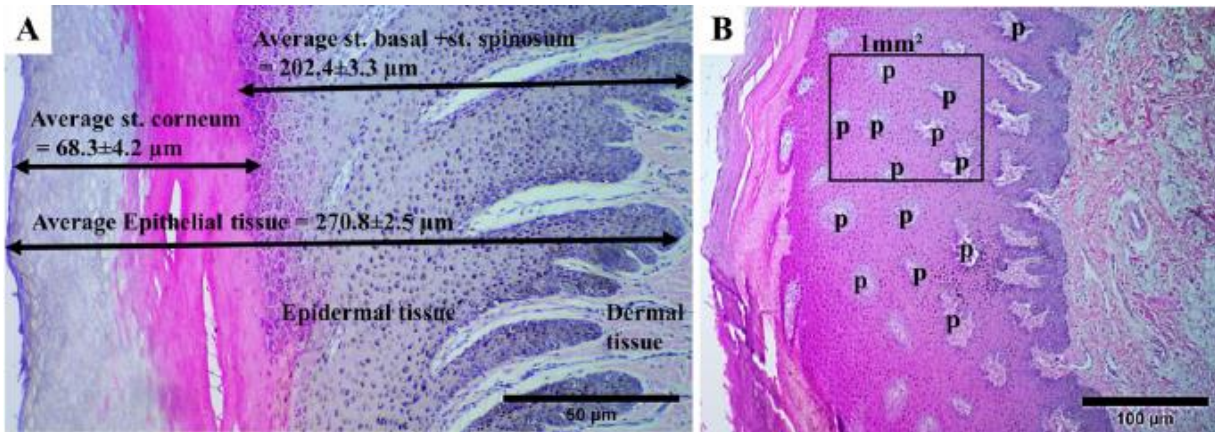


Figure 4. A) Photomicrographs illustrate measurements of epithelial coronary thickness were measured the average thickness of the basal and spinosum layers, corneum and lucidum respectively. B) Photomicrograph shows the number of (p) dermal papillae. Dermal papillae in each cross section of images were counted per surface area. (mm²). (H&E stain; (A) bar= 50 μ m; (B) bar =100 μ m).

Şekil 4. A) Fotomikrograflar, epitel koroner kalınlığının ölçümlerini sırasıyla bazal ve spinosum tabakalarının, korneum ve lucidumun ortalama kalınlıklarının ölçüldüğünü göstermektedir. B) Fotomikrograf dermal papilla sayısını (p) gösterir. Görüntülerin her bir kesitindeki dermal papillalar, yüzey alanı başına sayıldı. (mm²). (H&E stain; (A) bar= 50 μ m; (B) bar =100 μ m).

DISCUSSION and CONCLUSION

Analysis obtained from the cast resin for arterial blood supply revealed the presence of a complex arterial anastomosis in the blood vessels suggest that a greater blood flow capacity to the sheep feet; consequently, any defect in such complex arterial anastomosis of sheep feet may develop to ischemic necrosis (17,18). In addition, it was reported that these vascular anastomoses are capable to withdraw almost 50% of the entire limb blood flow, and hence can be engaged in ischemia due to vasoconstriction

and blood flow diversion (19). Cast form method enables following the blood vessels via the clear distribution of the capillary network. This method also showed the architecture distribution of blood anastomosis within the sheep foot. These results exhibit the main anastomosis of blood capillaries in proximal, distal and caudal part of sheep foot, which appears in Figure 1. These outcomes are contrary to that of (5,20), as they describe the blood supply of equine feet, however, our study showed similarity

with blood supply of caprine feet and with some differences with bovine feet (5). Furthermore, this study demonstrated the importance of morpho-organization of arterial anastomosis in ovine feet provide further support insights into the hypothesis that the arterial anastomosis of terminal arch and its branches are protected by the mesh of bony canal, as it is reported by other researcher in equine feet (4).

The first set of analyses examined coronary tissue stained with the routine stains H&E revealed the presence of three distinct layers: stratum externum represented by the periople, whereas stratum medium exhibited the main bulk of claw wall and finally the stratum internum showed the lamellae. The stratum medium was found comprised from finger shape projections organized parallel and oriented vertically from the surface of interconnection between dermal and epidermal tissues of the coronet toward the ground surface as expected from previous investigations (21-23). Furthermore, at the stratum externum and stratum medium showed many perioplic and coronary dermis were invaginated and papillated under the epidermis in a precise orderly way, which appeared to have a finger like projections extended and protruded deeply in epidermal tissue, and these papillary projections called dermal papillae. Comparison of these findings with those of other studies (24) confirms the complexity of mammalian integumentary structure that is found by the interdigaion of dermal papillae. Additionally, the ultimate forms of the capsular wall are generally defined by the configuration of the interface between dermal and epidermal tissue, which is determined in hoof wall by dermal papillae (25). In this study was observed that the core of each papilla contained connective tissue and blood vessels. It can thus be suggested that microanastomoses of these vessels are entered each papilla to supply epidermal tissue. The H&E stain exhibited the dermal and epidermal tissues in contrasting colors in pink and purple respectively, and highlighted the basement membrane border in a purple color. This finding is

consistent with recent study done by Al-Agele (26) on equine coronary dermal papillae.

The dermal area of the periople and/or coronary regions showed to be formed from mesh dense matrix of connective tissue including nerves, arteries and veins, as expected from previous observations (27). In contrast, the epidermal layer appeared to be comprised mostly from the stratified squamous keratinized epithelium and was observed continuous with the skin leg and appeared consisted from four expected layers. This finding is consistent with that of (28). According to these results, we can infer that the keratinous layer was directed simultaneously at an angle from the dermo-epidermal junction of dermal papillae toward the ground surface (26).

The results of measurements of the epithelial thickness indicated that average stratum basale, spinosum and granulosum was $202.4 \pm 3.3 \mu\text{m}$, and average stratum corneum was $68.3 \pm 4.2 \mu\text{m}$, while the whole epidermal tissue started from the basement membrane to the external surface was $270.8 \pm 2.5 \mu\text{m}$. It can therefore be assumed that the thickness of the epidermal layers dependent on the cornification of keratinocytes (29). Further analysis for the number of dermal papillae of coronary region on sheep claw revealed that the average number in the current study was found to be $11/\text{mm}^2$ and this was less than reported in horses, which showed $21/\text{mm}^2$ (26), and slightly less in cattle that reported $13/\text{mm}^2$ (30). The interpretations of these findings suggest the requirement for additional examination into the biophysical causes such as increases and/or decreases of growth rate of sheep claw. More analyses of the mechanobiological influences involved in determining the morphology of the claw wall are required and, particularly, the modifications which appear in lame sheep which might be consistent with the anatomy and has substantial consequences for claw function (31,32).

In conclusion, the biological properties of the claw wall have been measured sufficiently to enable an adequate material model providing new two

understandings into the normal compared with pathologically affected sheep feet, providing new evidence for potential treatment.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

The work was funded by College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq.

Acknowledgments

We would like genuinely to thank the staff of the department Anatomy and Histology-College of Veterinary Medicine and Science University of Diyala, for their invaluable help.

REFERENCES

1. Prentice DE., 1973. Growth and wear rates of hoof horn in Ayrshire cattle. *Res Vet Sci*, 14, 3, 285-290.
2. Aspinall V., Cappello M., 2015. Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook. 3rd edn., Elsevier, Gloucester.
3. König HE., Liebich HG., 2007. Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas. 2nd edn., 593-608, Schattauer, New York.
4. Al-Agele R., Paul E., Dvojmoc VK., Sturrock CJ., Rauch C., Rutland CS., 2019. The anatomy, histology and physiology of the healthy and lame equine hoof. In "Veterinary Anatomy and Physiology", ED., CS Rutland, 1st edn. IntechOpen, London.
5. Bragulla H., König HE., Liebich HG, 2007. Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas. 3rd edn., Schattauer, Verlag.
6. Dyce KM., Sack WO., Wensing CJG., 2009. Textbook of Veterinary Anatomy. 4th edn., Saunders, Missouri.
7. Pollitt CC., 2010. The anatomy and physiology of the suspensory apparatus of the distal phalanx. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 26, 1, 29-49.
8. Baxter GM., 2011. Adams and Stashak's Lameness in Horses. 6th edn., John Wiley & Sons, West Sussex.
9. Floyd A, Mansmann R., 2007. Equine Podiatry. 1st edn., Saunders, Missouri.
10. Kaler J., Green LE., 2009. Farmers' practices and factors associated with the prevalence of all lameness and lameness attributed to interdigital dermatitis and footrot in sheep flocks in England in 2004. *Prev Vet Med*, 92, 52-59.
11. Al-Agele R., Paul E., Taylor S., Watson C., Sturrock C., Drakopoul M., Atwood RC., Rutland CS., Menzies-Gow N., Knowles E., Elliott J., 2019. Physics of animal health: on the mechano-biology of hoof growth and form. *J R Soc Interface*, 16, 210-214.
12. Kaler J., Medley GF., Grogono-Thomas R., Wellington EMH., Calvo-Bado LA., Wassink GJ., King EM., Moore LJ., Russell C., Green LE., 2010. Factors associated with changes of state of foot conformation and lameness in a flock of sheep. *Prev Vet Med*, 97, 237-244.
13. Smith EM., Green OD., Calvo-Bado LA., Witcomb LA., Grogono-Thomas R., Russell CL., Brown JC., Medley GF., KilBride AL., Wellington EM., Green LE., 2014. Dynamics and impact of footrot and climate on hoof horn length in 50 ewes from one farm over a period of 10 months. *Vet J*, 201, 295-301.
14. Gelasakis A., Kalogianni A., Bossis I., 2019. Aetiology, risk factors, diagnosis and control of foot-related lameness in dairy sheep. *Animals*, 9, 509.
15. Olfert ED., Cross BM., McWilliam AA., 1993. Canadian Council on Animal Care-guide to the care and use of experimental animals, vol. 1. Brada Printing Services, Ottawa.
16. Al-Ajeely RA., Mohammed FS., 2012. Morpho-histological study on the development of kidney and ureter in hatching and adulthood racing pigeon (*Columba livia domestica*). *IJSN*, 3, 665-677.

17. Hood DM., Grosenbaugh DA., Mostafa MB., Morgan SJ., Thomas BC., 1993. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J Vet Intern Med*, 7, 228-234.
18. Bailey S., Elliott J., 1998. Plasma 5-hydroxytryptamine constricts equine digital blood vessels in vitro: implications for pathogenesis of acute laminitis. *Equine Vet J*, 30, 124-130.
19. Pollitt CC., 1992. The role of arteriovenous anastomoses in the pathophysiology of equine laminitis. In *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*.
20. Jennings R., Premanandan C., Cianciolo R., Wilkie D., Wong A., Kendziorski J., 2017. *Veterinary Histology*. Ohio State University, Ohio.
21. Banks WJ., 1993. *Applied Veterinary Histology*, 3rd edn., 390-392, Williams and Wilkins, Baltimore.
22. Bacha Jr WJ., Bacha LM., 2012. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 3rd edn., John Wiley & Sons, West Sussex.
23. Eurell JA., Frappier BL., 2013. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6th edn., Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
24. Bragulla H., Hirschberg RM., 2003. Horse hooves and bird feathers: Two model systems for studying the structure and development of highly adapted integumentary accessory organs—the role of the dermo-epidermal interface for the micro-architecture of complex epidermal structures. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 1, 140-151.
25. Sievers H., Hiebl B., Hünigen H., Hirschberg RM., 2019. Pododermal angioarchitecture in the equine hoof wall: A light and scanning electron microscopic study of the wall proper. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1, 1-24.
26. Al-Agele R., 2018. *Histopathological and ultrastructural characterization of equine hoof shape deformities*. University of Nottingham, School of Veterinary Medicine and Science, UK.
27. Hung J., Grossman A., Rodriquez-Sosa JR., Ruiz S., Hall MI., Plochocki JH., 2018. *Histological Study of Bovine Hoof Development*. *FASEB J*, 32,1, 773-777.
28. Blanpain C., Fuchs E., 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 207-217.
29. Alibardi L., 2009. Ultrastructural characteristics of the process of cornification in developing claws of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Acta Zool*, 90, 285-300.
30. Singh S., Murray R., Ward W., 1992. Histopathological and morphometric studies on the hooves of dairy and beef cattle in relation to overgrown sole and laminitis. *J Comp Pathol*, 107, 319-328.
31. Bhardwaj V., Dhungyel OP., de Silva K., Dhand NK., Whittington RJ., 2018. An objective method for assessment of foot conformation in sheep. *Small Rumin Res*, 167, 22-28.
32. Ajuda GG., Battini M., Stilwell GT., 2019. The role of claw deformation and claw size on goat lameness. *Vet Anim Sci*, 8, 80.



The Role of Serum Amyloid-A in Formaldehyde-Induced Kupffer Cell Apoptosis in Rats and Possible Protective Effects of Astaxanthin in This Process*

Aykut ULUCAN^{1a}, Hayati YUKSEL^{2b}, Emre SAHİN^{3c}, Seda YAKUT^{4d}

1. Bingöl University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Bingöl, TURKEY.
 2. Bingöl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Bingöl, TURKEY.
 3. Bingöl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Bingöl, TURKEY.
 4. Bingöl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Bingöl, TURKEY.
- ORCID: 0000-0001-8844-8237^a, 0000-0002-1724-1770^b, 0000-0001-7625-1883^c, 0000-0003-1673-5661^d

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
15.01.2020	16.02.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ulucan A, Yuksel H, Sahin E, Yakut S:The Role of Serum Amyloid-A in Formaldehyde-Induced Kupffer Cell Apoptosis in Rats and Possible Protective Effects of Astaxanthin in This Process. *Atatürk University J. Vet. Sci.*,15(1): 22-30, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.675315

Abstract: The aim of this study is to investigate the alterations related to Serum amyloid-A in formaldehyde-induced apoptosis in Kupffer cells and to determine whether Astaxanthin has a protective effect against apoptosis. In this experiment, 32 rats were divided into 4 groups (n=8). The first group was named as control group, physiological saline was injected intraperitoneally to this group, and drinking water was given orally. In CH₂O group, rats were injected with formaldehyde at a dose of 10 mg/kg daily intraperitoneally. The rats in CH₂O+ATX16 and CH₂O+ATX32 were injected with formaldehyde daily at a dose of 10 mg/kg intraperitoneally, and respectively 16 mg/kg and 32 mg/kg Astaxanthin were administered orally. Formaldehyde administration was caused by the highest and statistically significant Serum amyloid-A staining intensity (P<0.0125) and apoptotic index (P<0.05) in the CH₂O group. Both doses of Astaxanthin administration reduced apoptosis in Kupffer cells but there were no significant differences in serum Serum amyloid-A levels between experimental groups (P>0.05). As a result, oral administration of Astaxanthin has been shown to reduce Serum Amyloid A, which increases due to exposure to formaldehyde, and possibly in this way, Kupffer cells successfully protect against formaldehyde-induced apoptosis. The subject should be examined more comprehensively.

Keywords: Apoptosis, Astaxanthin, Formaldehyde, Kupffer Cell, Serum Amyloid-A.

Serum Amiloid-A'nın Sıçanlarda Formaldehit Kaynaklı Kupffer Hücre Apoptozundaki Rolü ve Astaksantin'in Bu Süreçteki Olası Koruyucu Etkileri

Öz: Bu çalışmanın amacı Kupffer hücrelerinde formaldehit kaynaklı apoptozda Serum amiloid-A ile ilgili değişiklikleri araştırmak ve Astaksantin'in apoptoza karşı koruyucu bir etkisi olup olmadığını belirlemektir. Bu deneyde 32 sıçan 4 gruba ayrıldı (n = 8). Birinci gruba kontrol grubu adı verildi ve serum fizyolojik intraperitoneal olarak bu gruba enjekte edildi ve içme suyu oral yolla verildi. CH₂O grubunda, sıçanlara günde 10 mg/kg dozda intraperitoneal yoldan formaldehit enjekte edildi. CH₂O+ATX16 ve CH₂O+ATX32'deki gruplarındaki sıçanlara günde 10 mg/kg intraperitoneal dozda formaldehit enjekte edildi ve sırasıyla 16 mg/kg ve 32 mg/kg Astaksantin oral yolla verildi. Formaldehit uygulaması CH₂O grubunda en yüksek seviyede ve istatistiksel olarak anlamlı Serum amiloid-A boyama yoğunluğuna (P<0.0125) ve apoptotik indekse (P<0.05) neden olmuştur. Her iki dozdaki Astaksantin uygulaması Kupffer hücrelerinde apoptozu azalttı, ancak deney grupları arasında serum Serum amiloid-A düzeylerinde anlamlı bir fark yoktu (P>0.05). Sonuç olarak, oral yolla Astaksantin uygulamasının formaldehit maruziyetine bağlı olarak artan Serum Amiloid A'yı azalttığı ve muhtemelen bu şekilde Kupffer hücrelerinin formaldehit kaynaklı apoptoza karşı başarıyla koruduğu gösterilmiştir. Konu daha kapsamlı bir şekilde incelenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Astaksantin, Formaldehit, Kupffer Hücresi, Serum Amiloid-A.

✉Aykut Ulucan

Bingöl University, Department of Medical Services and Techniques, Vocational School of Health Services, Bingöl, TURKEY.
e-mail: aulucan@bingol.edu.tr

* This study was partially supported by "Bingöl University Scientific Research Projects Coordination Unit" with BAP-VF.2017.00.001 project numbered project.

INTRODUCTION

Formaldehyde (CH₂O) is a substance that is commonly exposed and has both acute and chronic adverse effects on humans and animals health (1,2,3). Reactive oxygen species (ROS) are increases in the tissues affected by CH₂O, and this increase accelerates the apoptosis or necrosis (4,5). Antioxidant applications reduce CH₂O induced cell damage and oxidative stress (6). Astaxanthin (ATX) (3-3 dihydroxy β-β carotene 4-4 dione) is an antioxidant compound of the xanthophyll class of carotenoids found in microalgae, and aquatic animals (7), and it exhibits a wide range of biological activities such as anti-tumoral and anti-inflammatory effects (8).

Kupffer cells (KCs) are tissue macrophages that localized within the liver sinusoids and they have protective effects for homeostasis of the liver against various liver damages (9). The inflammatory stages related to cell injury or death that regulate the acute phase response are initiated by the activation of tissue macrophages, which released inflammatory mediators that are largely determined by the pathogenic conditions. In addition, inflammatory processes are responsible for the synthesis of Serum Amyloid-A (SAA), which is an acute phase apolipoprotein, produced by several different cell types, and their most important source, are macrophages (10).

The aim of this study is to investigate the alterations related to SAA in CH₂O-induced apoptosis in KCs and to determine whether ATX has a protective effect against apoptosis.

MATERIALS and METHODS

Experimental Animals and Study Desing

This study was conducted with the approval of Bingol University Animal Experiments Local Ethics Commission (20/02/2017 - 02-04). Thirty-two Male *Wistar albino* rats 9-10 weeks old and weighing 250-300 g were used in this experiment and fed ad libitum. The rats were randomly divided into 4 groups

(n=8) in each group and kept in a room with 22-24°C and the relative humidity was set 55% ± 5% and applied 12 hours light-dark cycle. Astaxanthin (Sigma-Aldrich, A3236, Germany) was prepared as an active ingredient in emulsion with drinking water. The first week was the preparation period for the experiment to ensure the adaptation of the rats.

The rats in the control group were injected intraperitoneally with 1 ml of physiological saline daily and 1 ml of drinking water was given intragastric gavage every day. In the CH₂O group, rats were injected intraperitoneally with 10 mg/kg of 10% diluted CH₂O daily and 1 ml of drinking water was given daily via intragastric gavage. The previous protocol was also applied to the CH₂O+ATX16 and CH₂O +ATX32 groups, but ATX was given every other day with intragastric gavage at a dose of 16 mg / kg and 32 mg / kg, respectively, instead of drinking water (11). The experimental process lasted for 14 days.

Anesthesia, Necropsy, Blood Processing and Tissue Samples

All rats were anesthetized using 5% Sevoflurane (Sevorane, Abbott Lab, USA) at until loss of righting reflex. Blood was collected intracardially in rats under anesthesia and then animals were euthanized by decapitation. The livers of all animals were removed during systemic necropsy and fixed in 10% buffered formaldehyde for 48 hours. Tissue samples were embedded in paraffin after routine histopathological procedures. Paraffin embedded tissues were cut into 5 μm thickness with rotary microtome (RM 2155, Leica, Germany) and transferred to the slide. Slides were stained with Hematoxylin and Eosin for histopathological examination and evaluated by using imaging system adapted light microscope (Leica, DM2500 / DFC295) (12).

Immunohistochemistry

The presence of SAA was demonstrated by minor modifications of the Streptavidin-Biotin Complex-Peroxidase (SABC-P) method using the anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, PA5-32262, USA) (13). Slides were visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), (Sigma-Aldrich, D4293, Germany) chromogen. Background stained with Mayer's Hematoxylin. The intensity and prevalence of immunopositive staining was scored between 0 and +3. No staining in Kupfer cells was scored as = 0. Stains between 1-9, 10-31, and ≥ 32 in Kupfer cells were scored as 1, 2, and 3, respectively. SAA staining intensity of KCs was examined microscopically and evaluated numerically by the blind analysis technique as indicated by small modifications of the literature (14,15).

TUNEL Assay

The presence of apoptotic KCs was investigated using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-triphosphate (dUTP) nick end labeling Assay method (TUNEL) using the ApopTag® Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit (Merck Milipore Corporation, CA 92590, USA). TUNEL staining protocol was performed according to the manufacturer's application manual. Percent-amounts of TUNEL-positive cells were examined by counting Kupffer cells from ten random hepatic lobules. The percentage of apoptotic cells (apoptotic index) was calculated according to the Aydin et al. (14).

ELISA Assays

Serum SAA levels in the samples were assayed using the SAA Sandwich-EIA kit (MyBioSource Inc., MBS2514609, USA). The ELISA kit protocol was adhered to when preparing reagents with samples and performing applications. OD value in the samples were automatically measured at 450 nanometers (nm) using ELISA reader (SpectraMax Plus 384, USA) (14). Test results have expressed as $\mu\text{g/mL}$ for SAA.

Statistical Analyses

SPSS 18.0.0 for Windows (Release 18.0.0, Copyright© SPSS Inc, The Apache Software Foundation, 1989-2009) used for statistical analyses. For parametric data, One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test performed to determine differences between the groups. For non-parametric data, Kruskal Wallis followed by Bonferroni correction of Mann Whitney-U test was performed to determine differences between groups. The $P < 0.05$ and $P < 0.0125$ ($0.05/4$) value was considered statistically significant for parametric and nonparametric data, respectively (16).

RESULTS

Clinical and Macroscopical Results

In the experiment, no clinical findings were observed except for the yellowing of the fur in the all rats in the CH_2O group.

Histopathological Results

There was no histopathological alteration in the liver tissues in the control group. In the CH_2O group, hydropic and vacuolar degeneration in the hepatocytes, diffuse activation in the KCs, enlargement in the sinusoids, and Remark cords disassociation were observed. There were a few hepatocytes with pyknotic nuclei suggesting marked hepatocellular degeneration. In addition, apoptotic changes in the cell nucleus were detected in most of the hepatocytes and KCs in hepatic lobules without necrosis in the CH_2O group. In the $\text{CH}_2\text{O} + \text{ATX16}$ group, the lesions were decreased in liver tissue compared to the CH_2O group. In the $\text{CH}_2\text{O} + \text{ATX16}$ group, the hydropic degeneration of hepatocytes decreased and the increase in KC in the hepatic parenchyma was limited. The lesions significantly suppressed in liver tissues of the $\text{CH}_2\text{O} + \text{ATX32}$ group, compared to the CH_2O group and $\text{CH}_2\text{O} + \text{ATX16}$ group.

Immunohistochemical Results

In the control group, the immunohistochemical SAA staining score of the KCs was observed to be 0 (negative) in most liver samples. The CH₂O group, unlike all other groups, had a statistically higher SAA staining density (Figure 1) ($P < 0.0125$). However, there was no significant difference between the ATX-treated groups and between these groups and the control group in terms of SAA intensity ($P > 0.0125$) (Figure 2).

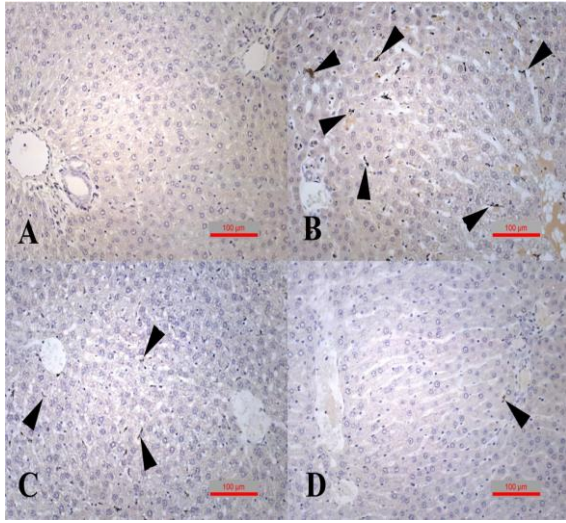


Figure 1. Anti-SAA immunoreactivity in the liver tissues, immunopositivity was showed with DAB chromogen and background stained with Mayer's Hematoxylin, x 200 magnifications. Arrowheads are shown anti-SAA immunopositivity of the KCs. A: No immunopositivity (score=0) in the control group; B: intense immunopositivity (score=3) in the CH₂O group; C: moderate immunopositivity (score=2) in the CH₂O+ATX16 group; D: weak immunopositivity (score=1) in the CH₂O+ATX32 group.

Şekil 1. Karaciğer dokularında anti-SAA immunoreaktiviteleri, immunopozitiflik DAB kromojen ile gösterildi ve zemin Mayer Hematoksileni ile boyandı, x 200 büyütme. Ok başları Kupffer hücrelerinde SAA immunopozitifliğini göstermektedir. A: kontrol grubunda immunopozitiflik yok (skor=0); B: CH₂O grubunda, yoğun (skor=3) derece immunopozitiflik; C: CH₂O+ATX16 grubunda, orta (skor=2) derece immunopozitiflik; D: CH₂O+ATX32 grubunda, zayıf (skor=1) derece immunopozitiflik.

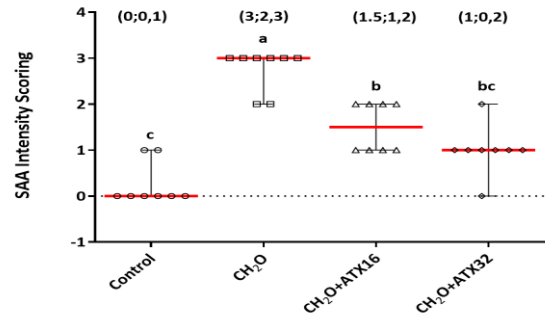


Figure 2. Effect of ATX on intensity of anti-SAA immunoreactivity in Kupffer cells in rats with CH₂O induced liver injury. Data are represented 95% confidence intervals for the median (Median; lower limit, upper limit). Kruskal Wallis followed by Bonferroni correction of Mann Whitney-U test performed determines differences between the groups. Statistical significance ($P < 0.0125$) indicated by different small alphabets (a, b, c) above the groups.

Şekil 2. CH₂O kaynaklı karaciğer hasarı olan sıçanlarda Kupffer hücrelerinde ATX'in anti-SAA immunoreaktivitesi yoğunluğu üzerindeki etkisi. Veriler ortanca için % 95 güven aralığını temsil etmektedir (Orta değer; alt limit, üst limit). Kruskal Wallis ve ardından yapılan Mann Whitney-U testinin Bonferroni düzeltmesi gruplar arasındaki farklılıkları belirlemektedir. İstatistiksel anlamlılık, grupların üzerindeki farklı küçük harflerle (a, b, c) belirtilmiştir ($P < 0.0125$).

Apoptotic KCs were observed rarely in the control group. Quantitatively, the highest number of TUNEL-positive KCs was observed in the CH₂O group (24.4 ± 5.52). Apoptosis of KCs in the ATX-administered groups was less than the CH₂O group (Figure 3). Comparisons of the apoptotic indexes between groups, and their response to CH₂O and ATX supplementation, with the statistical significances, are given in Figure 4. When there was no significant difference in the apoptosis indexes of KCs between the control, CH₂O+ATX16, and CH₂O+ATX32 groups ($P > 0.05$), while control, CH₂O+ATX16, and CH₂O+ATX32 groups were compared to the CH₂O group it was found that the CH₂O group had a higher apoptosis index in KCs and a statistically significant

difference ($P<0.05$) (Figure 4). All dosages of ATX administration reduced apoptosis in KCs. Also, apoptosis was detected in some hepatocytes in the CH_2O group.

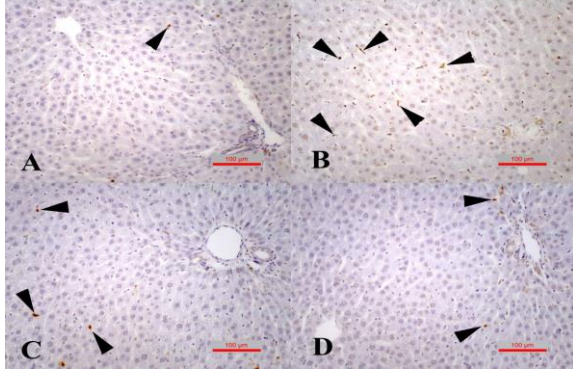


Figure 3. TUNEL staining of liver tissues, immunopositivity was showed with DAB chromogen and background stained with Mayer's Hematoxylin, x 200 magnifications. Arrowheads are shown Apoptotic Kupffer cells. A: Control group; B: CH_2O group; C: CH_2O +ATX16 group; D: CH_2O +ATX32 group.
Şekil 3. Karaciğer dokularının TUNEL boyanması, immunopozitiflik DAB kromojen ile gösterildi ve zemin Mayer Hematoksileni ile boyandı, x 200 büyütme. Ok başları apoptotik Kupffer hücrelerini göstermektedir. A: Kontrol grubu; B: CH_2O grubu; C: CH_2O +ATX16 grubu; D: CH_2O +ATX32 grubu.

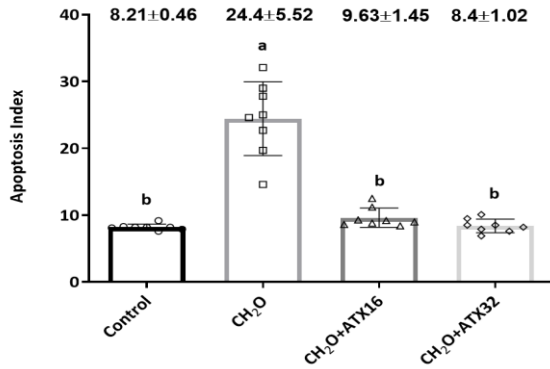


Figure 4. Effect of ATX on apoptosis index in KCs in rats with CH_2O induced liver injury. Data are represented as mean \pm standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test performed to determine differences between the groups. Statistical significance ($P<0.05$) indicated by different small alphabets (a,b) above the groups.

Şekil 4. CH_2O kaynaklı karaciğer hasarı olan sıçanlarda ATX'in KC'lerde apoptoz indeksi üzerindeki etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için post hoc Tukey testi yapıldı.

için post hoc Tukey testiyapıldı. Grupların üzerindeki farklılıklar küçük harflerle belirtilmiştir (a, b), istatistiksel anlamlılık ($P<0.05$).

ELISA Results

The data for the group means values of sera SAA levels in the control and experimental groups were given in Figure 5. By the ELISA technique, the highest sera SAA ($1.62 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$) level was observed in the CH_2O group. It was observed that an increase in sera SAA level in the CH_2O group compared to the other groups. However, there were no significant differences in serum SAA levels between experimental groups ($P>0.05$).

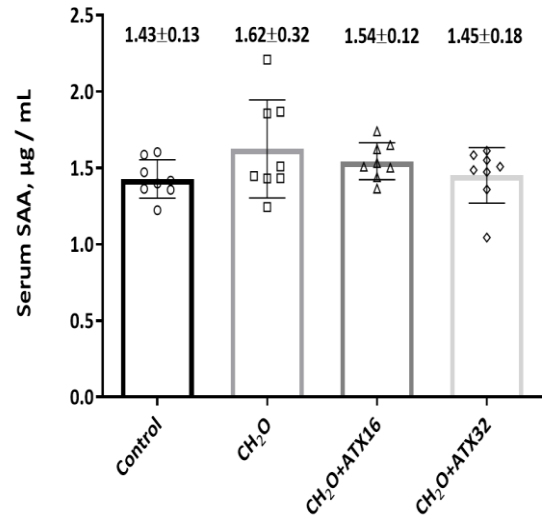


Figure 5. Effect of ATX on SAA levels in rats with CH_2O induced liver injury in sera. Data are represented as mean \pm standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test performed to determine differences between the groups.

Şekil 5. CH_2O kaynaklı karaciğer hasarı olan sıçanlarda ATX'in serum SAA seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için post hoc Tukey testi yapıldı.

DISCUSSION and CONCLUSION

It is known that the CH_2O has cytotoxic, hematotoxic, immunotoxic, and genotoxic effects (17,18). CH_2O is caused the cell death and apoptosis

by inducing DNA and chromosomal damage. The cause of DNA damage is due to oxidative stress in DNA, protein, and lipids, which is caused by the overproduction of free radicals (19,20). CH₂O damages various tissues by reducing their antioxidant capacity and interrupted their energy metabolism. It may be related to the apoptosis of KCs in oxidative damage caused by indirect cytotoxic effects of CH₂O. Antioxidant molecules can help prevent or eliminate this damage (14,19). An increase in the apoptosis index of KCs due to the cytotoxic effects of CH₂O observed in our study may also be related to the increase in sera SAA level.

CH₂O is metabolized in the liver after ingestion (6,21). The detoxifying process of CH₂O in the liver may indirectly cause oxidative stress (21,22). Researchers have found that a marked formation of ROS when rat hepatocytes were incubated with CH₂O (5). Due to oxidative stress (6,17), there may be an interaction between pathological changes in KCs and SAA level and an increase in the apoptosis index. This interaction can be inhibited by ATX that is a strong antioxidant against CH₂O toxicity of KCs.

The rats exposed to low to high dose CH₂O have been seen clinical signs, such as yellowing of the fur (14). In our study, as a clinical finding, it was observed that CH₂O caused yellowing of the furs while ATX inhibited this clinical finding.

CH₂O exposure has been shown to cause major changes in the histological structure of the liver. After administration of CH₂O, disruption of the parenchyma structure of hepatic lobules, presence of abnormal cell borders in some hepatocytes, dilated sinusoids and mild edema, irregularities in cell nuclei, activation of KCs, and some sings of fatty degeneration have been reported (23). It has been reported that CH₂O cause serious pathological changes like protoplasmic vacuolations and nuclear changes in the hepatocytes, as well as leucocytes infiltration (21,24). The increase in the number of KCs in CH₂O-treated animals' liver lobules was attributed to the accumulation of the CH₂O reactive chemical intermediates (25). In our study, the administration

of ATX at doses of 16 and 32 mg/kg against CH₂O related to the significant increase in the number of KCs and the pathology of hepatocellular morphology appears to have an important protective effect. In particular, it has been demonstrated histopathologically that the reaction of KCs to the toxic effect of CH₂O is reduced by administration of ATX at a dose of 32 mg/kg in CH₂O+ATX32 group.

During the hepatic injury, KCs become active macrophages with high synthesis and secretion of inflammatory mediators, ROS, and lysosomal and proteolytic enzymes (26). Histopathologically, apoptotic liver cells show shrinkage with acidophilic degeneration, in which chromatin mild condensation, breakage, and pyknosis (27). The reaction of KCs due to CH₂O exposure can occur in relation to both damage of hepatocytes and the response of other inflammatory cells. In this study, apoptosis-related cytoplasmic and nuclear findings observed in tissue samples of the groups that we applied CH₂O histopathologically in KCs and hepatocytes were more prominent compared to the other groups and were consistent with the current data.

Very high doses of CH₂O result in necrotic cell death with coagulation and liquefaction necrosis (5). It was shown that related to CH₂O exposure liver tissues exhibited TUNEL staining (apoptosis) and significant apoptotic index (14). In our study, while necrotic findings were not observed in liver tissues, apoptosis was observed in some hepatocytes as well as KCs.

Apoptosis is the most important event and first cellular response in molecular mechanisms of hepatic injury against a wide range of toxic substances (6,28). The phagocytosis of apoptotic bodies by KCs is likely an important mechanism in liver disease (28,29). Although the presence of apoptotic bodies in Kupffer cells has been reported in several studies, the data on the etiologic basis of this is insufficient. Phagocytosis of apoptotic hepatocytes by KCs and consequently the presence of TUNEL-positive staining has been reported (14,29),

as well as toxic substances such as CH₂O can directly lead KCs to apoptosis (6,21).

After the ingestion of natural ATX, the liver does not convert ATX into vitamin A or otherwise biochemically transform it. Instead, it is incorporated into low-density lipoprotein (LDL) or high-density lipoprotein (HDL) and distributed to the tissues by blood circulation (30). Especially ATX, provide protection against free radical damage to protect the defense mechanisms of the immune system. ATX has been shown to reduce lipid peroxidase levels and increase the expression of anti-apoptotic Bcl-2 and antioxidant genes (31). In our study, it has been demonstrated that the apoptosis index observed in KCs increased significantly due to the application of CH₂O, ATX inhibited this negative effect and showed a protective effect on KCs.

KCs represent the resident macrophages of the liver and are the critical cells for the phagocytosis of apoptotic lymphocytes (32). Hypotheses suggest that oxidative stress in KCs can cause apoptosis, and the apoptotic cells are recognized and phagocytized by adjacent KCs (26). KCs of healthy animals degraded SAA completely whereas KCs of LPS stimulated mice was showed increasing amounts of residual SAA product (33). In our study, our immunohistochemical and serological findings have been shown to be associated with CH₂O-dependent apoptosis of KCs and to prevent apoptosis in KCs by ATX's anti-oxidant ability. The serum SAA levels increasing related to CH₂O administration and decreasing related to ATX administrations were matching the immunohistochemical SAA intensity score of KCs.

As a result, formaldehyde exposure has promoted apoptosis of Kupffer cells. However, it has been found that oral administration of at a dose of 32 mg/kg Astaxanthin, which has antioxidant properties, has a more successful protective effect against the negative effects of formaldehyde-induced apoptosis and Serum Amyloid A levels and immunoreactivity of Kupffer cells.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The study materials were taken from our earlier work and this study was partially supported by "Bingöl University Scientific Research Projects Coordination Unit" with BAP-VF.2017.00.001 project numbered project.

REFERENCES

1. Hovda KE., McMartin K., Jacobsen D., 2017. Methanol and Formaldehyde. *Critical Care Toxicology: Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient*, 1: 1769-86. Springer Publishing.
2. Zendehtel R., Jouni FJ., Hajipour B., Panjali Z., Kheiri H., Vahabi M., 2017. DNA damage in workers exposed to formaldehyde at concentrations below occupational exposure limits. *Toxicol Environ Chem*, 99, 1409-1417.
3. Li L., Hua L., He Y., Bao Y., 2017. Differential effects of formaldehyde exposure on airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *PloS one*, 12, e0179231.
4. Songur A., Sarsilmaz M., Ozen O., Sahin S., Koken R., Zararsiz I., Ilhan N., 2008. The effects of inhaled formaldehyde on oxidant and antioxidant systems of rat cerebellum during the postnatal development process. *Toxicol Mech Method*, 18, 569-574.
5. Szende B., Tyihak E., 2010. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. *Cell Biol Int*, 34, 1273-1282.
6. Bakar E., Ulucam E., Cerkezayabekir A., 2015. Investigation of the protective effects of proanthocyanidin and vitamin E against the toxic effect caused by formaldehyde on the liver tissue. *Environ Toxicol*, 30, 1406-1415.
7. Peng J., Yuan J-P., Wang J-H., 2012. Effect of diets supplemented with different sources of astaxanthin on the gonad of the sea urchin *Anthocardia crassispina*. *Nutrients*, 4, 922-934.
8. Jyonouchi H., Sun S., Iijima K., Gross MD., 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of

- action. *Nutr Cancer*, 36, 59-65.
9. Kessler SM., Hoppstadter J., Hosseini K., Laggai S., Haybaeck J., Kiemer AK., 2019. Lack of Kupffer cell depletion in diethylnitrosamine-induced hepatic inflammation. *J Hepatol*, 70, 813-815.
 10. Bode JG., Albrecht U., Haussinger D., Heinrich PC., Schaper F., 2012. Hepatic acute phase proteins—regulation by IL-6-and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. *Eur J Cell Biol*, 91, 496-505.
 11. Lin K-H., Lin K-C., Lu W-J., Thomas P-A., Jayakumar T., Sheu J-R., 2016. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- γ and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes in vitro and ex vivo. *Int J Mol Sci*, 17, 44.
 12. Suvarna KS., Layton C., Bancroft JD., 2018. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book: Elsevier Health Sciences*.
 13. Vickers J., 2019. Immunohistochemistry techniques applicable for use with human brain tissue. In *Using CNS Autopsy Tissue in Psychiatric Research: A Practical Guide*, pp. 117-36: CRC Press.
 14. Aydin S., Ogeturk M., Kuloglu T., Kavakli A., Aydin S., 2015. Effect of carnosine supplementation on apoptosis and irisin, total oxidant and antioxidants levels in the serum, liver and lung tissues in rats exposed to formaldehyde inhalation. *Peptides*, 64, 14-23.
 15. Mengshol JA., Golden-Mason L., Arikawa T., Smith M., Niki T., McWilliams R., Randall JA., McMahan R., Zimmerman MA., Rangachari M., Dobrinskikh E., Busson P., Polyak SP., Hirashima M., Rosen HR., 2010. A crucial role for kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of t cell immunity in hepatitis c infection. *PloS one*, 5, 1-12.
 16. Ekuni D., Tomofuji T., Sanbe T., Irie K., Azuma T., Maruyama T., Tamaki N., Murakami J., Kokeguchi S., Yamamoto T., 2009. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol*, 54, 495-502.
 17. Aydemir S., Akgun SG., Beceren A., Yuksel M., Kumas M., Erdogan N., Sardas S., Omurtag GZ., 2017. Melatonin ameliorates oxidative DNA damage and protects against formaldehyde-induced oxidative stress in rats. *Int J Clin Exp Med*, 10, 6250-6261.
 18. Wei C., Wen H., Yuan L., McHale CM., Li H., Wang K., Yuan J., Yang X., Zhang L., 2017. Formaldehyde induces toxicity in mouse bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells and enhances benzene-induced adverse effects. *Arch Toxicol*, 91, 921-933.
 19. Reilly SM., Goel R., Trushin N., Elias RJ., Foulds J., Muscat J., Liao J., Richie Jr JP., 2017. Brand variation in oxidant production in mainstream cigarette smoke: Carbonyls and free radicals. *Food Chem Toxicol*, 106, 147-154.
 20. Vina J., 2018. Free Radical Theory Of Frailty: Molecular Mechanisms of Frailty Resulting From Oxidative Stress. *Innov Aging*, 2, 219.
 21. Cikmaz S., Kutoglu T., Kanter M., Mesut R., 2010. Effect of formaldehyde inhalation on rat livers: a light and electron microscopic study. *Toxicol and Health*, 26, 113-119.
 22. Özen OA., Kus I., Bakirdere S., Sarsilmaz M., Yaman M., 2011. Effects of formaldehyde inhalation on zinc, copper and iron concentrations in liver and kidney of male rats. *Biol Trace Elem Res*, 140, 177-185.
 23. Treesh S., Eljaafari H., Darmun E., Abu-Aisha A., Alwaer F., Eltubuly R., Elghedamsi M., Aburawi S., 2014. Histological study on the effect of formaldehyde on mice liver and kidney and possible protective role of selenium. *J Cell Tissue Res*, 14, 4201-4209.
 24. Cheng J., Zhang L., Tang Y., Li Z., 2016. The toxicity of continuous long-term low-dose formaldehyde inhalation in mice. *Immunopharm Immunot*, 38, 495-501.
 25. Nasiri E., Naserirad S., Pasdaran Lashgari A.,

- Gazor R., Mohammadghasemi F., Atrkar Roushan Z., 2016. Hepatoprotective effect of *Acantholimon bracteatum* (Girard) Boiss. on formaldehyde-induced liver injury in adult male mice. *RJP*, 3, 55-61.
26. Nguyen-Lefebvre AT., Horuzsko A., 2015. Kupffer cell metabolism and function. *J Enzymol Metab*, 1, 101.
27. Liu H., Li Q., Wang Y., Hong H., Chen M., Wang Y., Hong F., Yang S., 2017. Elevated nitric oxide levels associated with hepatic cell apoptosis during liver injury. *Hepatol Res*, 47, 178-185.
28. Iorga A., Dara L., Kaplowitz N., 2017. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis. *Int J Mol Sci*, 18, 1018.
29. Canbay A., Feldstein AE., Higuchi H., Werneburg N., Grambihler A., Bronk SF., Gores GJ., 2003. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology*, 38, 1188-1198.
30. Dhankhar J., Kadian SS., Sharma A., 2012. Astaxanthin: A potential carotenoid. *IJPSR*, 3, 1246.
31. Jang H., Ji S., Kim Y., Lee H., Shin J., Cheong H., Kim J., Park I., Kong H., Park C., 2010. Antioxidative effects of astaxanthin against nitric oxide-induced oxidative stress on cell viability and gene expression in bovine oviduct epithelial cell and the developmental competence of bovine IVM/IVF embryos. *Reprod Domest Anim*, 45, 967-974.
32. Cameron RG., Feuer G., 2012. Apoptosis and its modulation by drugs: Springer Science & Business Media.
33. Kuret T., Lakota K., Mali P., Cucnik S., Praprotnik S., Tomšič M., Sodin-Semrl S., 2018. Naturally occurring antibodies against serum amyloid A reduce IL-6 release from peripheral blood mononuclear cells. *PLoS one*, 13, e0195346.



The Favorable Effect of Swimming on Some Blood Parameters in Diabetic Rats

Nurcan DONMEZ^{1a}✉, Ercan KESKIN^{1b}, Mehmet OZSAN^{2c}, Omer Mahruf Ali SHOSHIN^{3d},
Bekir MEHTAP^{4e}

1. Selcuk University, Veterinary Faculty, Department of Physiology, Konya, TURKEY.

2. University of Bartın, Faculty of Engineering, Bartın, TURKEY.

3. Kirkuk University, Collage of Veterinary, Kirkuk, IRAQ.

4. University of Selcuk, Faculty of Sport Sciences, Konya, TURKEY.

ORCID: 0000-0003-4271-598X^a, 0000-0003-3839-0414^b, 0000-0001-9546-3478^c, 0000-0003-0715-8241^d, 0000-0003-0130-9408^e

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
26.12.2019	18.03.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Donmez N, Keskin E, Ozsan M, SHOSHIN OMA, Mehtap B: The Favorable Effect of Swimming on Some Blood Parameters in Diabetic Rats. *Atatürk University J. Vet. Sci.*, 15(1): 31-37, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.665357

Abstract: To investigate the effect of swimming on some hematological parameters in diabetic rats is the main goal of this study. 32 adult healthy rats were divided into Control (C), Diabetic (D), Exercise Control (E) and Diabetic+Exercise (DE) groups respectively. The rats in the control group were not soever treated, while the D and DE groups were injected 60 mg / kg streptozotocin (STZ) intraperitoneal (i.p). The trial continued for four weeks after the onset of diabetes. After the diabetes was formed, 1-hour swimming exercise for 4 weeks, 5 days a week was applied to groups E and DE during the trial period. At the end of the experiment (after 4 week) some hematological parameters (such as RBCs, Hb, Htc, platelet, WBC, differential leucocyte count) were determined in blood samples. RBCs, Hb and Htc values were reduced in D group. On the other hand, WBC and platelet count were increased in the same group. We observed RBC count, Hb and Htc levels were higher and WBC count was lower in DE group according to D group. As a result; current study was observed that regular aerobic exercise improves investigated parameters and demonstrates positive effects.

Keywords: Diabetes Mellitus, Exercise, Hematological Parameters, Rat, Swimming.

Diyabetik Sıçanlarda Yüzmenin Bazı Kan Parametreleri Üzerine Olumlu Etkisi

Öz: Diyabetik sıçanlarda yüzmenin bazı hematolojik parametreler üzerindeki etkisini araştırmak bu çalışmanın temel amacıdır. 32 yetişkin sağlıklı sıçan sırasıyla Kontrol (C), Diyabetik (D), Egzersiz Kontrolü (E) ve Diyabetik + Egzersiz (DE) gruplarına ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara hiçbir uygulama yapılmazken, D ve DE gruplarına intraperitoneal (i.p.) 60 mg / kg streptozotosin (STZ) enjekte edildi. Deneme, diyabetin başlamasından sonra dört hafta devam etti. E ve DE gruplarına, diyabet oluşturulduktan sonra, deneme süresini içeren 4 haftalık periyotta, haftada 5 gün olmak üzere 1 saat yüzme egzersizi yaptırıldı. Deneme sonunda (4 hafta sonra) kan örneklerinde bazı hematolojik parametreler (RBC, Hb, Htc, trombosit, WBC, diferansiyel lökosit sayısı gibi) belirlendi. D grubunda RBC, Hb ve Htc değerleri düştü. Diğer taraftan, aynı grupta WBC ve trombosit sayısı artmıştır. DE grubunda RBC, Hb ve Htc düzeylerinin daha yüksek, WBC sayısının ise daha düşük olduğunu gözlemledik. Sonuç olarak; çalışmada düzenli aerobik egzersizin incelenen parametreleri iyileştirdiği ve olumlu etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, Egzersiz, Hematolojik Parametreler, Rat, Yüzme.

✉ Nurcan Dönmez

Selcuk University, Veterinary Faculty, Department of Physiology, Konya, TURKEY.
e-mail: nurcandonmez@selcuk.edu.tr

INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) is a serious disease of metabolism which can be induced important problems because of the pancreas gland cannot produce insulin hormone adequately or the insulin hormone it produces cannot be used effectively (1). DM damages various organs, causing acute and chronic complications (2-4). Besides being a very serious and progressive disease, it causes acute and chronic complications when not controlled and negatively affects morbidity and mortality, resulting in a great health problem for both individuals and society (5). Along with rapid changes in lifestyle, DM prevalence is rapidly increasing across all developed and developing populations. The main causes of this increase in DM prevalence are population aging, unhealthy nutrition, obesity and sedentary lifestyles (4).

Physical activity and sport are extremely important for a healthy and long life. It can affect hematological and biochemical parameters as in many systems. Human physical adaptation to exercise is characterized by adaptation of cardiovascular system and alterations in hematological and biochemical parameters (1,6-8). The main goal of DM treatment is to protect or retard chronic complications of diabetes by optimally maintaining blood glucose, lipid profile and also blood pressure level. For blood glucose control, lifestyle changes such as exercise and diet are of primary importance. It improves glycemic control, lipid profile, immunity and decreases insulin resistance. On the other hand, physical training such as walking, cycling, running swimming can also play a role as a stress factor, stimulating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (1,9,10). Exercise has been considered an important therapeutic regimen in addition to nutrition and drug therapy in the treatment of diabetes mellitus for a long time (11,12). Regular physical exercises help to improve glycemic control while preventing diseases like cardiovascular disease, type 2 Diabetes mellitus

(T2DM) and also obesity. (13-15). Most activities such as walking, cycling, rowing, running, swimming and also jogging lead to aerobic energy consumption. Similar exercises such as these involve continuous and repetitive movements of large muscle groups (16). Aerobic exercise is very important because of its utility effects on most hematologic and biochemical parameters, as it decreases metabolism risk factors along with insulin resistance in the treatment of T2DM. Most studies on this subject have shown the favorable effects of aerobic exercise with distinct density on T2DM treatment (12,16).

The positive effects of regular exercise on metabolism are well known, but the role of exercise on diabetes is little known, and experimental diabetic rats are used as a human model for T2DM. Regular exercises are alternative treatment support programs for both type 1 and T2DM (12). Therefore, in the present study, we have examined the favorable and preventive effects of swimming exercise on some blood parameters in diabetic rats.

MATERIAL and METHODS

Animals and Treatment

In the present study, 32 healthy male Wistar Albino rats with weights of 280 ± 20 g and aged 70-80 days were used. Rats have been provided from the KONUDAM (Experimental Medicine Application and Research Center of Necmettin Erbakan University). The research design was approved by the KONUDAM Ethics Committee for Animal Studies (Ethics code: 2014-042). The rats were housed in plastic rat cages in the experimental animal unit at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ at room temperature and in a $50 \pm 10\%$ humidified environment at a 12/12 night/day light cycle and they were fed ad-libitum with a standard rat diet. Rats were provided ad libitum access to water (~ 50 ml/day/rat) to be refreshed daily for four weeks.

The animals were divided into Control (C), Diabetic (D), Exercise Control (E) and Diabetic+Exercise (DE) groups respectively.

Induction of Diabetes

A single dose of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg, Sigma S0130-1G) solution was injected intraperitoneally (i.p) in rats and a diabetes model was created in diabetic groups (D, DE) (17, 18). Group E and Group DE trained 5 d/wk for 4 weeks. The STZ solution was prepared by dissolving 60 mg / kg STZ (Sigma S0130-1G) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) before application. After STZ injection, checking blood glucose was done after 72 h fast from the tail with blood glucose meters (plusMED). All the animals who obtained blood glucose above 250 mg/dl were contemplated diabetic. After 4 weeks of application, blood samples were taken from the animals by cardiac puncture under anesthesia into anticoagulant for determination.

Swimming Training Protocol

Swimming training program began after induction of diabetes. Swimming exercise was performed in the swimming tank (100x60 cm) ($32 \pm 1^\circ\text{C}$). The animals began experimental period that consisted of four weeks of the swim for 60 minutes, five days a week.

Hematological Analyses

Leucocyte (WBC), erythrocyte (RBC), differential leucocyte and thrombocyte (PLT) count, hemoglobin (HB) and hematocrit (HTC) levels were determined in blood samples. Hematological parameters were measured with Auto Hematology Analyzer (Mindray BC800).

Statistical Analyses

Statistical analysis of the obtained findings and determining the importance of the differences between the groups were made using the SPSS 16.0 package program. The significance between groups was determined Duncan's Multiple Range test in analysis of variance (ANOVA). Significant was considered as $P < 0.05$.

RESULTS

In this study, the effect of swimming exercise on some hematological parameters in STZ-induced diabetic rats were summarized Table 1 and 2. Diabetes reduced RBCs, Hb and Htc values, on the other hand WBC count and platelet increased significantly ($P < 0.05$) in D group.

Table 1. Some hematological parameters in experimental groups ($X \pm SX$).

Table 1. Deney gruplarında bazı hematolojik parametreler ($X \pm SX$).

	C	E	D	DE	p
WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.50 ± 0.20^c	6.52 ± 0.44^b	8.14 ± 0.57^a	6.94 ± 0.65^{ab}	<0.05
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.19 ± 0.17^{ab}	8.86 ± 0.10^a	6.99 ± 0.50^b	7.18 ± 0.61^b	<0.05
Hb (gr/dl)	14.93 ± 0.27^{ab}	15.78 ± 0.31^a	12.26 ± 0.68^c	13.80 ± 0.58^b	<0.05
Htc (%)	48.25 ± 1.02^a	50.05 ± 1.55^a	36.28 ± 2.52^b	48.15 ± 3.26^a	<0.05
Plt (L)	779.83 ± 37.72^a	579.66 ± 82.02^b	832.66 ± 31.48^a	608.16 ± 62.03^b	<0.05

a, b, c; $P < 0.05$. WBC : White Blood Cel, RBC : Red Blood Cel, Hb : Haemoglobin, Htc : Hematocrit, Plt : Platelet.

Table 2. Differential leucocyte counts (%) in experimental groups ($X \pm SX$).

Table 2. Deney gruplarında diferansiyel lökosit sayısı (%), ($X \pm SX$).

%	C	E	D	DE	p
Lym	70.37 ± 1.19^a	39.31 ± 10.13^b	73.15 ± 3.76^a	57.53 ± 6.21^b	<0.05
Mon	3.03 ± 0.70	4.02 ± 2.24	3.69 ± 1.00	6.81 ± 2.57	>0.05
Neu	24.75 ± 0.97^b	53.18 ± 7.59^a	21.30 ± 3.22^b	33.21 ± 5.41^b	<0.05
Eos	1.08 ± 0.27	1.65 ± 0.66	0.75 ± 0.46	1.04 ± 0.22	>0.05
Bas	0.81 ± 0.17	1.78 ± 0.88	1.53 ± 0.18	1.76 ± 0.43	>0.05

a, b; $P < 0.05$. Lym: Lymphocyte, Mon: Monocyte, Neu: Neutrophil, Eos: Eosinophil, Bas: Basophil

RBC count, Hb and Htc levels in the DE group was higher and total WBC count reduced than D group (Table 1).

Lymphocyte count was significantly increased and neutrophil count was reduced in diabetic group (D) compared with the other groups (especially E and DE Group). The basophile count was tending to increase in experimental groups compared with C group (Table 2).

DISCUSSION and CONCLUSIONS

Regular exercise is very important to prevent or treat many chronic diseases and their complications (8,19). DM is very important and serious chronic metabolic endocrine disorder and wants definitive therapy. Many studies on this subject reveal that exercise is effective in improving T2DM. While exercise can improve glycemic control, it can also increase insulin sensitivity and complications associated with reverse diabetes, such as cardiovascular damage, which is considered one of the main complications (12,20).

Aerobic exercise has positive effects on the hematological and biochemical parameters, such as cholesterol, triglyceride, insulin and glucose level and cytokines. Daily swimming training can be beneficial effects on blood parameters in diabetics (12,21). Some studies showed that exercise activities have significantly improved hematocrit, hemoglobin levels and RBC count in pregnant women, athletes, patients with T2DM, and STZ induced diabetic (36,38).

Ghisai et al. (22) have reported that leukocytes count was decreased and percentage of neutrophils were increased in exercise treated diabetic rats, while Crespilho et al. (1) said that there was no significant change in both total leukocytes counts and leukocyte counts in exercise- induced diabetic rats. Moreover, Nazıroglu et al. (23) have reported that leukocyte count was significantly increase in exercise treated diabetic rats when it compared to diabetic group.

Sugiura et al. (24) have reported that chronic exercise training improves the macrophage and

lymphocyte function. In this study, the increase in leukocyte count in exercised group is similar to the other results that founded in various studies (1,25). Chaar et al. (25) reported an increase in the leukocyte count due to mobilization of leukocytes and inflammatory responses which occur as a consequence of exercise. In this study, the increase in the number of neutrophils and monocytes in total leukocyte count was observed only in exercise group. McFarlin et al. (26) have reported that increasing in leucocyte count after exercise and remained the same for two hours. But Crespilho et al. (1) reported no differences between diabetic and exercise groups. On the other hand, some researchers reported an increase in lymphocyte, NK, T and B cell counts after exercise. Also, Neves et al. (27) and Kostycki et al. (8) informed that increase in leukocyte count depended on the period and density of exercise. Crespilho et al. (1) have observed that exercise affects opposite in increasing neutrophil count in diabetes. Eosinophil count may variate under stress. The increase in total leukocyte count in experimental diabetes may be due to an increase in free radicals, a decrease in antioxidant activity, and an increase in inflammatory cytokines.

In diabetic animals and humans, a relative decrease in lymphocyte ratios in leukocyte types and an increase in neutrophil count were observed (28-30). Kozlov et al. (28) reported moderate neutrophilic leukocytosis and prolonged circulation times of neutrophils and monocytes in diabetic mice and suggested that count may also show low-grade inflammation. But in this study, neither lymphocyte nor neutrophil ratios were significantly change had been observed. Our results were at the same consistent with the last literatures. Also, in some study, an increase in rate of lymphocyte in leukocyte types had been reported in diabetic animals (31).

It is well known that anemia occurred in chronic diseases. Increased lipid peroxide production and membrane protein oxidation in diabetes causes hemolysis of RBC resulting from hyperglycemia (30,32-34). Also, the observed parallel reductions in

RBCs, Hb and HTC values in diabetic animals group in the results of this study was reported in the results of some other researches (30,31,35,37). Increases in leukocyte and platelet counts with diabetes are consistent with studies conducted in this respect (32).

There were no significant changes in RBC count, Hb and Htc levels between control and experimental groups in our study and these findings were similar between Chaar et al. (25) and Crespilho et al. (1)'s results. Also, in this study the RBCs count, Hb and Htc levels in the ED group was significant highest than the D group, these levels in the exercise and D group was significantly lower than the E group. Also, there was a slightly increased in the levels of last previous parameters when we compared between exercise and diabetic group and only diabetic group, there is no mentions of importance between this two groups. After exercise, significant increasing in erythrocyte count may be the result of hemoconcentration (33).

In conclusion of this study, the results showed that the regularly swimming exercise performed in the experimentally diabetic rats with STZ has a positive effect on hematological parameters. Data obtained in this study could be used later as a basis to plan the duration, intensity and continuance of exercise as one of available modalities for treatment of diabetes mellitus.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Crespilho DM., Curiacos de Almeida Leme JA., Rostom de Mello MA, Luciano E., 2010. Effects of physical training on the immune system in diabetic rats. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 30, 33-37.
2. Saito M., Kuratsune H., Nitta H., Kawahara K., Hamano M., Matsuda M., Kaku K., Eto M., 2006. Plasma Lipid Levels and Nutritional Intake in Childhood- and Adolescence-Onset Young Type 1 Diabetic Patients in Japan. *Diabetes Research and Clin Prac*, 73, 29-34.
3. Valentovic MA., Alejandro N., Carpenter AB., Brown PI., Ramos K., 2006. Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(α)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol Letters*, 164, 214-220.
4. Cambay Z., 2011. Investigation of the effects of pomegranate flower (punica granatum) on serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels in diabetic rats. *Ecological Life Sci*, 6, 124-133.
5. Tanriverdi MH., Çelepkolu T., Aslanhan H., 2013. Diabetes mellitus and primary health care. *J Clin Exp Invest*, 4, 562-567.
6. Balducci S., D'Errico V., Haxhi J., Sacchetti M., Orlando G., Cardelli P., Vitale M., Bollanti L., Conti F., Zanuso S., Lucisano G., Nicolucci A., Pugliese Get., 2019. Effect of a behavioral intervention strategy on sustained change in physical activity and sedentary behavior in patients with type 2 diabetes: The IDES-2 randomized clinical trial. *JAMA*, 321, 880.
7. American Diabetes Association., 2019. 5. lifestyle management: standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42, S46.
8. Kostrycki IM., Frizzo MN., Wildner G., Donato YH., Santos AB., Rhoden CR., Ludwig MS., Heck TG., 2016. Hematological response of acute exercise in obese mice: The obesity attenuation effect on leucocytes response. *J Exercise Physiol*, 19, 85-93.
9. Hevener AL., Reichart D., Olefsky J., 2000. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes*, 49, 2154-2159.
10. Contarteze RV., Machado FdeB., Gobatto CA., De Mello MA., 2008. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, 151, 415-422.
11. Sigal RJ., Kenny GP., Wasserman DH., Castaneda-Sceppa C., 2004. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2518-2539.

12. Thent ZC., Das S., Henry LJ., 2013. Role of exercise in the management of Diabetes Mellitus: The Global Scenario. *PloS One*, 8, e80436.
13. Ahmad MA., 2019. Moderate-intensity continuous training: is it as good as high-intensity interval training for glycemic control in type 2 diabetes? *J Exerc Rehabil*, 15, 327-333.
14. Hu FB., Manson J., Stampfer M., Graham C., 2001. Diet, lifestyle and risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England J Med*, 345, 790-797.
15. Ehiaghe FA., Agbonlahor DE., Etikerentse SMO., Osador HB., 2013. Effect of exercise induced stress on serum cortisol level and CD4 cell count in rats. *African J Cellular Path*, 1, 14-18.
16. Colberg SR., Sigal RJ., Yardley JE., Riddell MC., Dunstan DW., Dempsey PC., Horton ES., Castorino K., Tate DF., 2016. Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 39, 2065-2079.
17. Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi MR., Jamshidi Sh., Farhangi A., Allah Verdi A., Mofidian SMA., Lame Rad B., 2007. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*, 22, 60-64.
18. Maciel RM., Costa MM., Martins DB., Franca RT., Schmatz R., Graca DL., Duarte MM., Danesi CC., Mazzanti CM., Schetinger MR., Paim FC., Palma HE., Abdala FH., Stefanello N., Zimpel CK., Felin DV., Lopes ST., 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res Vet Sci*, 95, 389-397.
19. Eljsovgels TMH., Thompson PD., 2015. Exercise is medicine at any dose? *JAMA*, 314, 1915-1916.
20. Momma H., Sawada SS., Kato K., Gando Y., Kawakami R., Miyachi M., Huang C., Nagatomi R., Tashiro M., Ishizawa M., Kodama S., Iwanaga M., Fujihara K., Sone H., 2019. Physical Fitness Tests and Type 2 Diabetes Among Japanese: A Longitudinal Study From the Niigata Wellness Study. *JAMA*, 321, 139-146.
21. Stewart KJ., 2002. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA*, 288, 1622-1631.
22. Ghisai R., Soufi FG., Mohaddes G., Somi MH., Ebrahimi H., Alihemmati A., Bavil FM., Alipour MR., 2014. Effects of regular swimming on WBC profile, inflammatory mediators and histopathology of pancreatic tissue of high fat-induced diabetes in adult male rats. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 3, 14-20.
23. Naziroglu M., Şimşek M., Kutlu M., 2004. Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats. *Clin Chem Lab Med*, 42, 511-517.
24. Sugiura H., Nishida H., Sugiura H., Mirbod SM., Iwata H., 2000. Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. *Acta Physiol Scand*, 168, 413-420.
25. Chaar V., Romana M., Tripette J., Broquere C., Huisse MG., Hue O., 2011. Hardy-Dessources MD, Connes P. Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. *Clin Hemorheology and Microcirculation*, 47, 15-25.
26. McFarlin BK., Mitchell JB., McFarlin MA., Steinhoff GM., 2003. Repeated endurance exercise affects leukocyte number but no NK cell activity. *Med Sci Sports Exerc*, 35, 1130-1138.
27. Neves PRDS., Tenorio TRDS., Lins TA., Muniz MTC., Pithon-Curi TC., Botero JP., 2015. Acute effects of high and low intensity exercise bouts on leucocyte counts. *J Exerc Sci Fit*, 13, 24-28.
28. Kozlov IA., Novitski VV., Baikov AN., 1995. Kinetics of blood leukocytes in mice with alloxan diabetes. *Bull Exsp Biol Med*, 120, 33-35.
29. Mahmoud AM., 2013. Hematological alterations in diabetic rats-role of adipocytokines and effect of citrus flavonoids. *EXCLI J*, 12, 647-657.

30. Keskin E., Donmez N., Kılıçarslan G., Kandır S., 2016. Beneficial Effect of Quercetin on Some Hematological Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 5, 65-68.
31. Nikseresht A., Fehrest Haghighi Sh., Solhjoo K., Kargar Jahromy H., 2013. Effect of maximum activity on the immune system cells in diabetic rats. *Journal of Jahrom Univ Med Sci*, 10, 42-47.
32. Naziroglu M., Butterworth PJ., 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin- induced diabetes. *Can J Appl Physiol*, 30, 172-185.
33. Oyedemi SO., Yakubu MT., Afolayan AJ., 2011. Antidiabetic activities of aqueous leaves extract of *Leonotis leonurus* in streptozotocin induced diabetic rats. *J Med Plant Res*, 5, 119-125.
34. Donmez N., Donmez HH., Keskin E., Kisadere I., 2012. Effects of Aflatoxin on Some Haematological Parameters and Protective Effectiveness of Esterified Glucomannan in Merino Rams. *TSWJ Article ID 342468*.
35. Colak S., Geyikoğlu F., Aslan A., Deniz GY., 2014. Effect of lichen extracts on haematological parameters of rats with experimental insulin-dependent diabetes mellitus. *Tox and Ind Health*, 30, 878-887.
36. Hassanpour G., Hosseini SA., Keikhosravi F., Noura M., 2017. The Effect of Swimming Training with Cinnamon Extract on Hematological Factors in Diabetic Rats. *Iranian J Diabetes and Obesity*, 9, 101-106.
37. Silva RP., Santos RO., Matildes NEJ., Mundim AV., Garrote-Filho MD., Rodrigues PF., Penha-Silva N., 2017. Influence of the use of testosterone associated with physical training on some hematologic and physical parameters in older rats with alloxan-induced diabetes. *Arch Endocrinol Metab*, 61, 62-69.
38. Al Shehri ZS., 2017. The relationship between some biochemical and hematological changes in type 2 diabetes mellitus. *Biomed Res and Therapy*, 4, 1760-1774.



Some Clinicopathological Changes in Buffalo Calves Infected with Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ Detected by Direct ELISA

Israa Abdulghani AL-ROBAIEE^{1a}, Maab Ibrahim AL-FARWACHI^{1b}✉

1. University of Mosul, College of Veterinary Medicine, Department of Internal and Preventive Medicine, Mosul, IRAQ.
ORCID: 0000-0003-1983-2491^a, 0000-0002-2288-6274^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
31.10.2019	12.03.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/Tocitethisarticle:

Al-Robaiee IA, Al-FarwachiMI: Some Clinicopathological Changes in Buffalo Calves Infected with Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ Detected by Direct ELISA. Atatürk University J. Vet. Sci.,15(1): 38-42, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.640914

Abstract: The objective of recurrent study was to determine the some clinicopathological (hematological and biochemical) changes in native buffalo calves (aged between 1-15 day) infected with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ detected by direct ELISA, during the period between September 2018- April 2019. A total of 40 fecal samples (30 samples from infected animal and 10 samples from clinically healthy Buffalo calves) was examined by direct ELISA. Six samples form diarrheic animals (20%) were positive for *E. coli* (K99). The blood gas analysis of blood samples revealed significant decrease in the means of the blood pH, Partial pressure of oxygen concentration (PO₂), Partial pressure of carbon dioxide concentration (PCO₂), base excess (BE), as well as electrolytes: sodium (Na⁺), chloride (CL⁻), bicarbonate (HCO₃⁻), calcium (Ca⁺⁺) and nonionized calcium (nCa⁺⁺) ions concentrations, while a significant increase in the mean of hemoglobin concentration (tHB), packed cell volume (PCV) and anion gap (AG) in the buffalo calfs infected with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ comparison with the control animals. The main clinicopathological changes in native buffalo calves infected with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ were significantly decrease in electrolytes, blood gases, Calcium (Ca⁺⁺) and nonionized Calcium (nCa⁺⁺) ions concentrations.

Keywords: Blood Gases, Buffalo Calves, Clinical Pathology, Direct ELISA, *E. coli*.

Direkt ELISA ile Tanısı Konmuş, Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ ile Enfekte Manda Yavrularındaki (Malak) Bazı Klinikopatolojik Değişiklikler

Öz: Bu çalışmanın amacı, Eylül 2018 - Nisan 2019 tarihleri arasında, direkt ELISA ile Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ tespit edilen doğal buffalo buzağlarındaki (1-15 gün arası) klinikopatolojik (hematolojik ve biyokimyasal) bazı değişiklikleri belirlemektir. Toplam 40 dışkı örneği (enfekte hayvandan 30 örnek ve klinik olarak sağlıklı Buffalo buzağlarından 10 örnek) direkt ELISA ile incelendi. Diyareik hayvanlardan alınan altı numune (%20), *E. coli* (ETEC) K99⁺ için pozitif. Kontrol grubundaki hayvanlarla karşılaştırıldığında, Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ ile enfekte olmuş hayvanların kan örneklerindeki kan gazı analizi kan pH'ı, kısmi oksijen konsantrasyonu basıncı (PO₂), kısmi karbondioksit konsantrasyonu (PCO₂), baz fazlalığı (BE) ve ayrıca elektrolitler: sodyum (Na⁺), klorür (CL⁻), bikarbonat (HCO₃⁻), Kalsiyum (Ca⁺⁺) ve iyonlaştırılmamış Kalsiyum (nCa⁺⁺) iyonları konsantrasyonlarında önemli azalmaya, hemoglobin konsantrasyonu (tHB), hematokrit (PCV) ve anyon açığı (AG) değerlerinde ise önemli bir artışa neden oldu. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ ile enfekte olmuş doğal buffalo buzağlarındaki ana klinikopatolojik değişikliklerden; elektrolitler, kangazları, Kalsiyum (Ca⁺⁺) ve iyonize olmayan Kalsiyum (nCa⁺⁺) iyonları konsantrasyonları önemli ölçüde azaldı.

Anahtar Kelimeler: Direkt ELISA, *E. coli*, Kan Gazları, Klinik Patoloji, Manda Yavrusu (Malak).

✉Maab I. AL- Farwachi

University of Mosul, College of Veterinary Medicine, Department of Internal and Preventive Medicine Mosul, IRAQ.
e-mail: maabalfwche@yahoo.com

INTRODUCTION

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a pathogenic serotype causes enteric form of colibacillosis in neonate buffalo calves (1,2). The main two virulence factors of ETEC are the K99 fimbrial adhesion antigen (F5), and the heat-stable (STa or STb) enterotoxin (3,4). The K99 antigen contributes in attaching of the bacteria to the intestinal epithelium; thus, the bacteria proliferate and produce the enterotoxin that results in excessive secretion of fluid causing severe watery diarrhea (5,6). Consequently, severe dehydration can occur rapidly ending to death within 24 hours (7). The mortality constitutes an economic burden to the producers (8,9).

Clinical symptoms associated with colibacillosis are usually accompanied with variety of metabolic disorders manifested by changes in biochemical indices and hematological parameters (10,11). Prevalence of *E. coli* infection in buffalo calves has been reported in different countries around the world. In Pakistan, the studies reported prevalence of *E. coli* (15.3%) in buffalo calves (12), In Egypt the infection rate of *E. coli* 73.3% (11), In England, Sherwood et al. (13) record ETEC in 7.51% of diarrheic calves, but not from clinically normal calves.

In Iraq, the prevalence of *E. coli* K99 was 80% of diarrheic and 20% of non-diarrheic buffalo calves aged (3-11 day) (14).

Up to our knowledge, there is no previous study published about ETEC K99⁺ in buffalo calves in Mosul. The objective of recurrent study was to determine the some clinicopathological (hematological and biochemical) changes in native buffalo calves (aged between 1-15 day) infected with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ detected by direct ELISA.

MATERIALS and METHODS

Fecal Sample

Thirty samples from infected calves and 10 samples from clinically healthy buffalo calves were examined by direct ELISA.

A total of 30 buffalo calves fed on whole milk (aged between 1-15 day) were randomly selected from the diarrheic cases came to the veterinary teaching hospital/college of veterinary medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq, between September 2018 - April 2019. A ten fecal samples were collected from clinically healthy (negative by direct ELISA) buffalo calves as a control group. After collection of fecal samples and transportation to the laboratory, they would be storage at -20 °C until examined by ELISA test.

All fecal samples were examined using Safranin-Methylene blue technique (SMB) (15) to ensure absence of *Cryptosporidium* oocysts in the fecal samples. This study was conducted in accordance with ethical principles.

A commercial direct ELISA kit (BIO-X *E. COLI* F5 ELISA KIT, Bio-x Diagnostics, Belgium) was used for detection of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ antigen in the fecal samples according to the manufacturing company.

Blood samples were collected from infected and clinically healthy animal for blood gas analysis. A total of 5 ml of venous blood was drawn from the jugular vein puncture into heparinized vials capped and placed on ice immediately to avoid alteration in blood gas tension. Blood pH, partial pressure of oxygen (pO₂), partial pressure of carbon dioxide (pCO₂), base excess (BE), electrolytes: sodium (Na⁺), chloride (CL⁻), bicarbonate (HCO₃⁻), Calcium (Ca⁺⁺) and nonionized Calcium (nCa⁺⁺) ion concentrations, hemoglobin concentration (tHB), packed cell volume (PCV) were determined by blood gas analyzer (OPTI Critical Care analyzer/OPTI Medical Systems) within 3 h after sampling at 37°C, commercial chloride test kit (Fortress diagnostic, British) used to determine chloride ion concentration.

Statistical Analysis

The data represented as means (±SE) were statistically analyzed by T test using SPSS version 21.

Differences between affected and control groups were considered significant when the value of $P \leq 0.05$.

RESULTS

This study showed that six samples of total 30 examined buffalo calves were positive to *E. coli* (K99) with total infection rate 20%. The infected calves revealed significant variations in the means of following parameter: blood pH, PO_2 , PCO_2 , BE, electrolytes: Na^+ , Cl^- , K, HCO_3^- , Ca^{++} and nCa^{++} ions, tHB, PCV) concentration compared with control animals (Tables 1 and 2).

Table 1. Hematological and blood gas analysis in six infected buffalo calves with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ detected by direct ELISA.

Tablo 1. Direkt ELISA ile tespit edilen Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ ile enfekte altı bufalo buzağısında hematolojik ve kan gazı analizi.

Parameter	Groups	
	Control	Infected
pH	7.39 ± 0.06	7.02 ± 0.02*
PO_2 (mmHg)	43 ± 0.82	37.4 ± 0.63*
PCO_2 (mmHg)	50 ± 0.9	39 ± 0.72*
BE (mmol/L)	2.91±0.2	-1.8±0.35*
tHB (g/100 ml)	9.69±0.23	12.08±0.34*
PCV (%)	32.20±0.71	39.8±0.89*

*Means significant change from control at $P \leq 0.05$. PO_2 : Partial pressure of oxygen, PCO_2 : Partial pressure of carbon dioxide, BE: Base excess, tHB: Total hemoglobin concentration, PCV: Packed cell volume.

Table 2. Electrolytes changes in six infected buffalo calves with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ detected by direct ELISA.

Tablo 2. Direkt ELISA ile tespit edilen Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) K99⁺ ile enfekte altı bufalo buzağısında elektrolit değişiklikler.

Parameter	Groups	
	Control	Infected
Na (mmol/L)	129±1.03	117±1.18*
CL (mmol/L)	89.9±0.6	80.2±1.08*
K (mmol/L)	3.8±0.09	3.4±0.08
HCO_3^- (mmol/L)	29.2± 0.4	19.1±1.13*
Ca^{++} (mmol/L)	0.80±0.01	0.60±0.01*
nCa^{++} (mmol/L)	0.81±0.01	0.59±0.03*

*Means significant change from control at $P \leq 0.05$. Na: Sodium, CL: Chloride, K: Potassium, HCO_3^- : Bicarbonate, Ca: Calcium, nCa: non-ionized calcium.

DISCUSSION and CONCLUSION

E. coli is considered predominant agent of enteric disease in domestic animals, particularly in cow calves, buffalo calves, piglets and lambs, as well as diarrhoea in humans (2,16,17).

Escherichia coli is a dominant enteropathogen among diarrheic buffalo calves (18). In the current study, six samples were positive for *E. coli* K99 (infection rate 20%). This rate is lower than those documented in Babil (58.3%) (14) and in Egypt 73.6% (11) while higher to what was reported in Pakistan (15.3%) (12) and lower than those documented in Babil (58.3%) (2014) and in Egypt 73.6% (11).

The infected buffalo calves showed hematological and biochemical changes due to dehydration and *E. coli* infection. The result revealed significant increase of tHB and PCV level which may be due to decrease in plasma fluid or release of epinephrine as a result of stress in the infected animal, causing a compensatory mechanism leading to an increase in the level of tHB and PCV (19,20). The increase in hemoglobin concentration may also be attributed to increase the body demands for hemoglobin in order to ward off changes in the blood pH. The hemoglobin accepts the hydrogen ion from carbonic acid in the case of acidosis (19,21).

The results of the study indicated a significant decrease in the values of blood pH level, PO_2 , PCO_2 , value of BE and concentration rates of sodium ion, bicarbonate, Chloride ion, calcium ion and nonionized calcium. The above changes indicate the occurrence of dehydration and acidosis in calves with diarrhea (11,22).

In conclusion, the main clinicopathological changes in native buffalo calves infected with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K99⁺ were significant decrease in electrolytes, blood gases, Calcium (Ca^{++}) and nonionized Calcium (nCa^{++}) ions concentrations.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by College of Veterinary Medicine, University of Mosul.

REFERENCES

1. Radostits OM., Gay CC., Hinchcliff KW., Constable PD., 2007. Veterinary. Medicine. A text book of disease of cattle, sheep, pigs and horse 10th ed., Saunders Elsevier, Edinburgh, pp, 847-871.
2. Constable PD., Hinchcliff KW., Done SH., Grünberg W., 2017. Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 11th ed. Vol. 2 Elsevier Health Sciences, pp, 1879-1899.
3. Kaper JB., Nataro JP., Mobley HL., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2, 123-140.
4. Hosein HI., Azzam RA., Abo-Elwafa M., Menshawy AMS., Rouby S., 2019. Virulence profile of enteropathogenic escherichia coli (epcc) isolated from the cases of neonatal calf diarrhea. Adv Anim Vet Sci, 7, 755-760.
5. Acres SD., 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. J Dairy Sci, 68, 229-235.
6. Hosein HI., 2018. Infectious Diseases of domestic animals. Text book, Fourth edition, Lazer center for publication and distribution, Beni Suef, Egypt.
7. Cho Y., Yoon KJ., 2014. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Sci, 15, 1-17.
8. Rana N., Raut AA., Khurana SK., Manuja A., Saini A., 2012. Isolation and biotyping of *Salmonella* and *Escherichia coli* associated with neonatal buffalo calves. Indian J Anim Sci, 82, 676-678.
9. Bashahun GM., Amina A., 2017. Colibacillosis in calves: A review of literature. J Anim Sci Vet Med, 2, 62-71.
10. Niaz B., Khan AMT., Javed AH., Khalid MA., 2000. Hematological studies in induced buffalo neonatal calves diarrhea with enteropathogenic *E. coli*. Pakistan Vet J, 20, 85-89.
11. Ghanem MM., El-Fkhrany SF., Abd El-Raof YM., El-Attar HM., 2012. Clinical and haematobiochemical evaluation of diarrheic neonatal buffalo calves (Bubalus Bubalis) with reference to antioxidant changes. Benha Vet Med J, 23, 275-288.
12. Khan JA., Khan MS., Khan MA., Avais M., Maqbool A., Salman M., Rehman Z., 2009. Epidemiology of major bacterial and viral causes of diarrhea in Buffalo calves in three districts of the Punjab province of Pakistan. Pakistan J Zool (Supplementary Series) 9, 187-193.
13. Sherwood D., Snodgrass DR., Lawson GHK., 1993. Prevalence of *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England. Vet Res, 113, 208-212.
14. Al-Mafraji AMR., 2009. Detection of *E. coli* K99 and Rota virus antigens in diarrheic and healthy buffalo of Babil Province, Iraq. Al-Anbar J Vet Sci, 7, 17-21.
15. Baxby D., Blundell N., Hart CA., 1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J Hyg, 93, 317-323.
16. Borriello G., Lucibelli MG., De Carlo E., Auriemma C., Cozza D., Ascione G., Scognamiglio F., Iovane G., Galiero G., 2012. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (Bubalus bubalis). Res Vet Sci, 93, 18-22.
17. Gruenberg W., 2016. Overview of Coli-septicemia. Merck Manual, 11th Edn. Merck Sharp & Dohme Corp. USA.
18. Srivani M., Reddy Y., Narasimha Subramanyam KV., Lakshman M., Kavitha KL., Ramanipushpa RN., 2019. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrhoeic buffalo calves. Indian J of Comp Microbiol

- Immunol Infect Dis, 40, 37-41.
19. Coles EH., 1986. Veterinary clinical pathology. 4th ed. Saunders Company, Philadelphia, pp, 203-240.
 20. Shekhar S., Ranjan R., Singh CV., Kumar P., 2017. Prevalence, clinicohaemato-biochemical alterations in colibacillosis in neonatal calves. Int J Current Microbiol App Sci, 9, 3192-3198.
 21. Bashir S., Ashraf I., Dar AM., Majid A., Bhat AA., Farooq J., 2015. Isolation and detection of *Escherichia coli* from diarrheic calves along with biochemical and hematologic parameters. J. Cell Tissue Res., 15,2,5059-61.
 22. Malik S., Kumar A., Verma AK., Gupta MK., Sharma SD., Sharma AK., Rahal A., 2013. Haematological profile and blood chemistry in diarrhoeic calves affected with colibacillosis. J Anim Health Prod, 1, 10-14.



Protective Effect of Silymarin on Diethylnitrosamine Induced Hepatocellular Carcinoma Model in Wistar Rats; Cancer Patterns and Cytological Variants *

Emin KARAKURT^{1a}, Serpil DAG^{1b}

1. Kafkas University, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kars, TURKEY.
ORCID: 0000-0003-2019-3690^a, 0000-0001-7667-689X^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
28.01.2020	31.03.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Karakurt E, Dag S: Protective Effect of Silymarin on Diethylnitrosamine Induced Hepatocellular Carcinoma Model in Wistar Rats; Cancer Patterns and Cytological Variants. Atatürk University J. Vet. Sci., 15(1): 43-50, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.680945

Abstract: In this study, the protective effect of silymarin was investigated with histopathological methods in terms of cancer patterns and cytological variants in the hepatocellular carcinoma model created by applying diethylnitrosamine experimentally in rats. For this purpose, the rats were randomly divided into 5 groups. The rats in the control group were fed pellet feed and drinking water for 20 weeks. Animals in Sham group were administered with propylene glycol dissolved in 0.9% NaCl intraperitoneally 3 times a week for 20 weeks. Animals in DEN group administered DEN at a dose of 50 mg/kg once a week for 20 weeks. The rats in the DEN +Silymarin group were Silymarin intraperitoneally administered for 21 weeks 3 times a week at a dose of 100 mg/kg, starting 1 week prior to the administration of DEN. Silymarin was administered to rats in the group of Silymarin 3 times a week intraperitoneally for 20 weeks at a dose of 100 mg/kg. At the end of the study, systemic necropsy of the animals was performed and liver tissue samples were taken. After routine tissue procedures, sections were examined under the light microscope. We observed that Hepatocellular carcinoma occurred in DEN and DEN + Silymarin groups.

Keywords: Diethylnitrosamine, Hepatocellular Carcinoma, Patterns, Silymarin, Variants.

Wistar Ratlarında Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Hepatoselüler Karsinom Modelinde Silimarin'in Koruyucu Etkisi; Kanser Paternleri ve Sitolojik Varyantlar

Öz: Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak Dietilnitrozamin uygulanarak oluşturulan Hepatoselüler karsinom modelinde Silimarin'in koruyucu etkisi kanser paternleri ve sitolojik varyantlar açısından histopatolojik metodlarla araştırılmıştır. Bu amaçla ratlar 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara 20 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi. Sham grubundaki hayvanlara %0.9 NaCl içerisinde çözdürülmüş propilen glikol intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere 20 hafta boyunca verildi. DEN grubundaki hayvanlara 50 mg/kg dozunda haftada 1 kez olmak üzere 20 hafta boyunca DEN uygulaması yapıldı. DEN+Silimarin grubundaki ratlara DEN uygulamasından 1 hafta önce başlayacak şekilde 100 mg/kg dozunda haftada 3 kez olmak üzere 21 hafta boyunca intraperitoneal yolla Silimarin uygulandı. Silimarin grubundaki ratlara 100 mg/kg dozunda 20 hafta boyunca intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere Silimarin uygulandı. Çalışmanın sonunda, hayvanların sistemik nekropsisi yapıldı ve karaciğer doku örnekleri alındı. Rutin doku takip işlemlerinden sonra kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi. DEN ve DEN+Silimarin gruplarında Hepatoselüler karsinom oluştuğunu gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: Dietilnitrozamin, Hepatoselüler Karsinom, Paternler, Silimarin, Varyantlar.

[✉] Emin Karakurt

Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kars, TURKEY.
e-mail: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

*This work was supported by the Research Fund of Kafkas University (Project Number: 2016-TS-08, PhD thesis).

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver malignancy, describe as the second and sixth cancer-related deaths in men and women in the world (1,2). The prognosis of HCC is poor and the five-year survival rate is below 16% (3,4). The incidence of HCC with high mortality is primarily due to diagnosed in advanced stages (5). The prevalence of HCC is increasing in various regions of the world. HCC has higher prevalence in Africa (sub-Saharan) and Asia (Eastern) regions where the hepatitis B virus infection is endemic; it also has increasing prevalence in Western countries (North and South Europe, North America) due to the increasing averages of alcoholic liver disease and hepatitis C infection (6).

Diethylnitrosamine (DEN) is well known as strong hepatocarcinogen and hepatotoxin, is synthesized endogenously and located in agricultural chemicals, cosmetics, pharmaceutical preparations, tobacco smoke, soybean, cheese and food preservatives (7,8). Silymarin is a polyphenolic flavonoid derived from the seeds and fruits of the *Silybum marianum* L. (Milk thistle) has been used in the treatment of various diseases as diabetes, cancer, hepatitis and liver cirrhosis (9,10).

In our study, we aimed to research the role of DEN in the rat HCC model, and evaluate in detail the anticarcinogenic effect of Silymarin by histopathological methods in terms of cancer patterns and cytological variants.

MATERIALS and METHODS

Animals and Experimental Design

The study was performed on fifty male Wistar-Albino rats. Animals were obtained from the Erzurum Veterinary Control Institute Experimental Animals Unit. Standard temperature (23 ± 2 °C), humidity (%55) and light/dark conditions (12-hour day-night cycle) were provided for the rats. They were hosted in the Kafkas University Experimental Animals in the Application and Research Center Laboratory. During

the trial, the animals were given standart feed and water ad libitum. The ethics committee report of the study was obtained from Kafkas University Animal Experimentals Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK-2015-095, Date: 17.12.2015). The rats were randomly divided into 5 groups. 1. Control Group (n=10): Pellet feed and drinking water were given for 20 weeks. 2. Sham Group (n=10): Propylene glycol (75/25) dissolved in 0.9% NaCl was administered intraperitoneally three times a week. 3. Silymarin Group (n=10): Silymarin was administered as a dose of 100 mg/kg intraperitoneally three times a week for 20 weeks. 4. DEN Group (n=10): DEN was administered as a dose of 50 mg/kg intraperitoneally once a week for 20 weeks. 5. DEN + Silymarin Group (n=10): DEN was administered as a dose of 50 mg/kg intraperitoneally once a week for 20 weeks. Silymarin was administered as a dose of 100 mg/kg intraperitoneally administered intraperitoneally for 21 weeks, three times a week, starting 1 week before DEN administration. At the end of the study, systemic necropsy was performed on rats under pentobarbital anesthesia.

Histopathological Investigations

Liver samples from rats were fixed in 10 % buffered formaldehyde solution. After routine tissue procedures, paraffin blocks were prepared and sections with a thickness of 5 μ m were taken for Hematoxylin Eosin (H&E) staining. Sections were examined with H&E in the light microscope to determine the histopathological patterns & cytological variants and photographed with Cell ^P Program.

RESULTS

In the histopathological examination of Control (Fig. 1A), Sham (Fig. 1B) and Silymarin Group (Fig. 1C) livers; we observed that the liver tissue retained its normal lobular and sinusoidal structure, hepatocyte plates had a proper arrangement. Hepatocytes were

detected to be similar in size and shape. HCC was observed in the animals of the DEN group. Trabecular and acinar pattern were detected as dominant in tumor tissue. In some areas only, trabecular structures were observed (Fig. 2A), whereas in some areas only acinar structures were present (Fig. 2B). There were also areas where these two patterns are mixed (Fig. 2C). The trabecular structures were 3-10 cells thick and were separated by sinusoid-like spaces that were placed by endothelial cells. Lightly eosinophilic stained content was rarely present in lumen in pseudoglandular structures consisting in acinar pattern. Tumor cells showed morphological similarity to normal hepatocytes and it was observed that the differentiation was well. In some areas, it was determined that the hepatocytes were in cuboidal even columnar shapes (Fig. 2D). The cytoplasm of tumor cells was observed to be eosinophilic. The nucleus / cytoplasm ratio increased in favor of the nucleus. Nucleus showed atypical character. It was determined that the nuclei could be round, oval or irregular and showed hyperchromasia. In some areas, the nucleoli were eosinophilic, single and prominent, while in some areas the number was increased. In addition, large areas of liver tissue

surrounded by fibrous capsule and filled with blood in the liver, bile duct hyperplasia, large and small vacuoles in the form of fat degeneration, increased connective tissue, bile pigment, cells with transparent cytoplasm (clear cells) (Fig. 2E), pale bodies (Fig. 2F) and hyaline droplets (Fig. 2G) were also histopathological changes observed in the tumor tissue. Although mitosis was observed in a large number in some areas, it was negligible in some areas (Fig. 2H). In rats administered with DEN+Silymarin, HCC was diagnosed. In some areas only, trabecular structures were observed (Fig. 3A), whereas in some areas only acinar structures (Fig. 3B) were present. Similar to the DEN group, the common histopathological pattern was a mix pattern with trabecular and acinar structures (Fig. 3C). In addition; different degrees of atypia (Fig. 3D), nuclear irregularity, increased nucleus-cytoplasm ratio, hyperchromasia, cavernous areas filled with blood, bile duct hyperplasia, fat vacuoles in hepatocytes, increased connective tissue, bile pigment, clear cells (Fig. 3E), pale bodies (Fig. 3F), hyaline degeneration (Fig. 3G) and mitotic figures (Fig. 3H) were observed in tumor tissue.

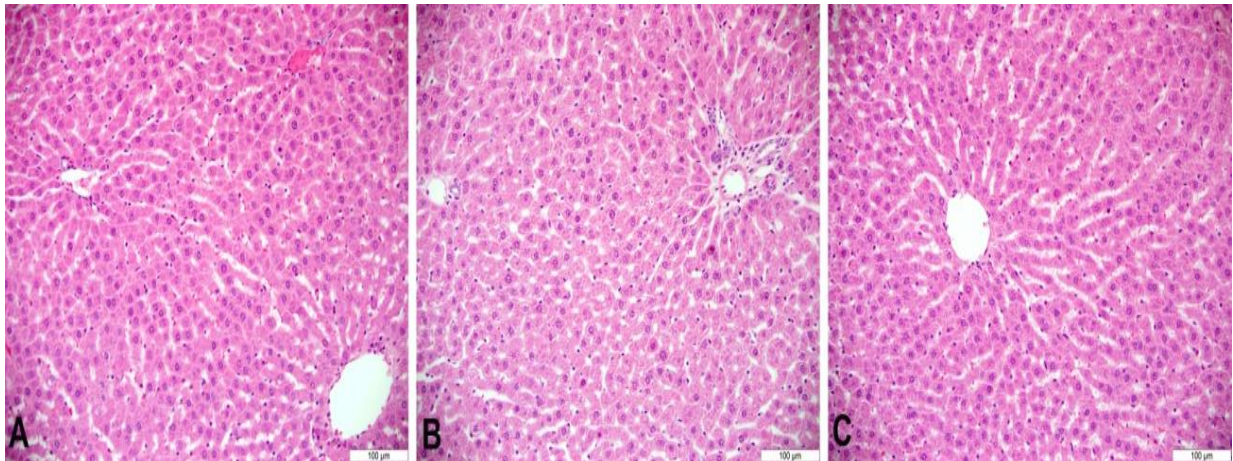


Figure 1. Control Group, H&E (A), Sham Group (B), Silymarin Group (C).

Şekil 1. Kontrol Grubu, H&E, (A), Sham Grubu (B), Silimarin Grubu (C).

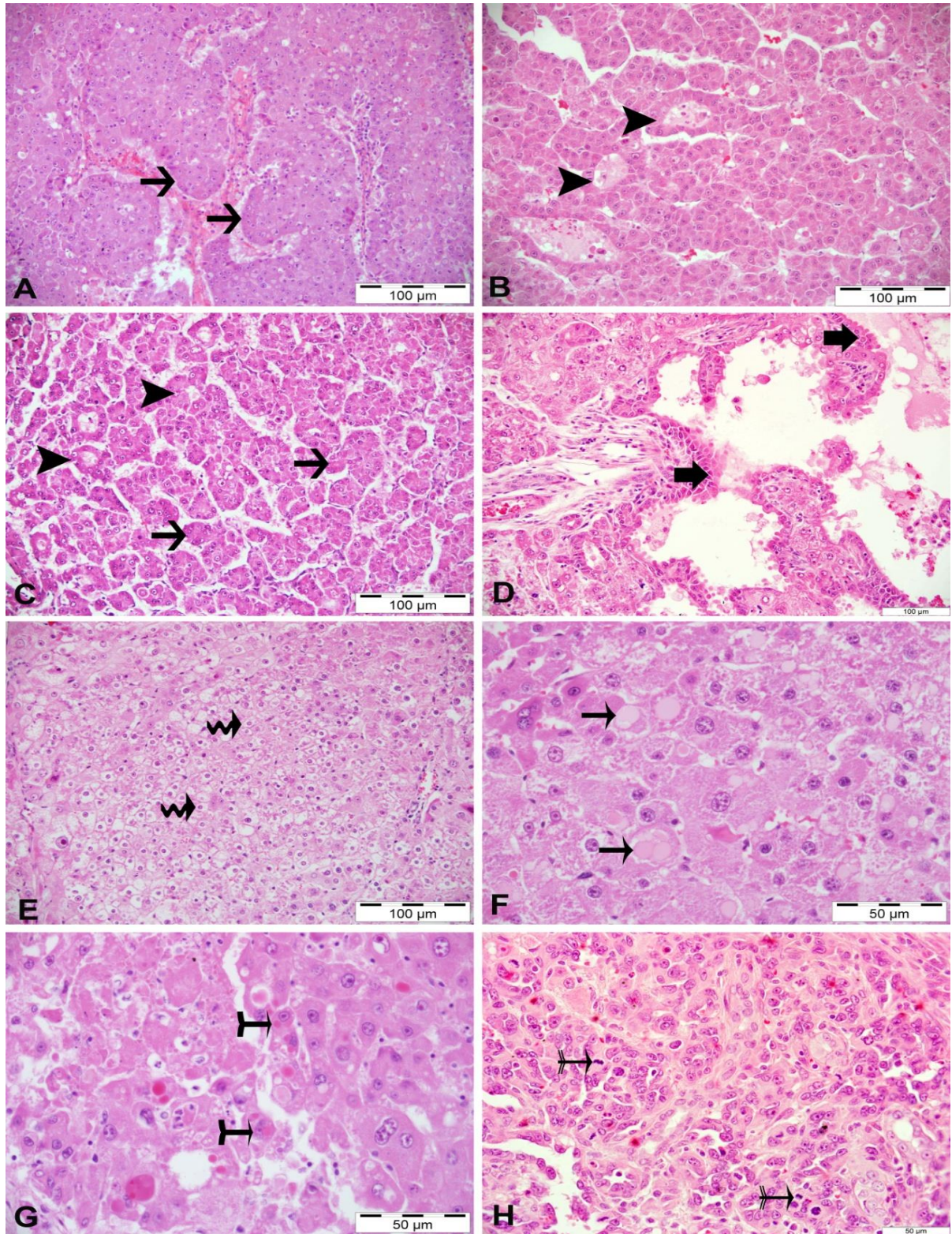


Figure 2. DEN Group, H&E, trabecular (arrows) structures (A), acinar (arrowheads) structures (B), trabecular (arrows) and acinar (arrowheads) structures (C), atypical tumor cells (arrows) (D), clear cells (arrows) (E), pale bodies (arrows) (F), hyaline droplets (arrows) (G), mitotic figures (arrows) (H).

Şekil 2. DEN Grubu, H&E, trabeküler (oklar) yapılar (A), asiner (ok başları) yapılar (B), trabeküler (oklar) ve asiner (ok başları) yapılar (C), atipik tumor hücreleri (oklar) (D), şeffaf hücreler (oklar) (E), soluk cisimcikler (oklar) (F), hiyalin damlacıkları (oklar) (G), mitotik figürler (oklar) (H).

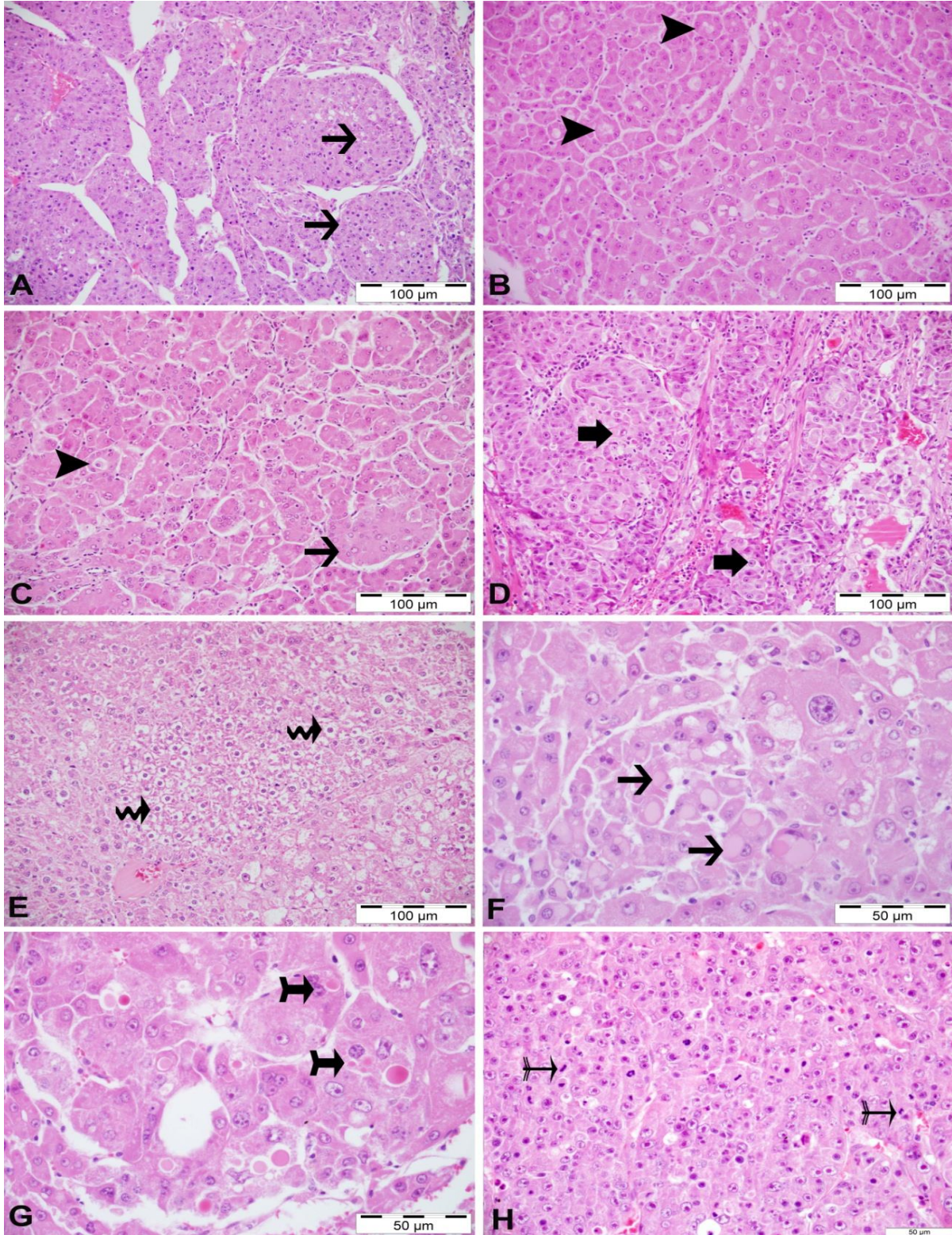


Figure 3. DEN+Silymarin group, H&E, trabecular structures (arrows) (A), acinar structures (arrowheads) (B), trabecular (arrow) and acinar (arrowhead) structures (C), pleomorphism in tumor cells (arrows) (D), clear cells (arrows) (E), pale bodies (arrows) (F), hyaline droplets (arrows) (G), mitotic figures (arrows) (H).

Şekil 3. DEN+Silymarin Grubu, H&E, trabeküler yapılar (oklar) (A), asiner yapılar (okbaşları) (B), trabeküler (ok) ve asiner (okbaşı) yapılar (C), tümör hücrelerinde pleomorfizm (oklar) (D), şeffah hücreler (oklar) (E), soluk cisimcikler (oklar) (F), hiyalin damlacıkları (oklar) (G), mitotik figürler (oklar) (H).

DISCUSSION and CONCLUSION

Four histopathological patterns exist in HCC. These are trabecular, pseudoglandular, solid and cirrhotic patterns (11). The trabecular pattern is the most common pattern and is also referred to as sinusoidal pattern (12). In this pattern, the cell layers are 3 or more cells thick (13). Thickness of even 5 to 10 cells, seldomly up to 20 cell-layered trabeculae may occur (11). The acinar pattern of HCC is also referred to as pseudoglandular or adenoid pattern. It is less common than the trabecular pattern. The pseudoglandular pattern is characterized by gland-like structures and acini (14). The acinar pattern can often be seen as a mix in the trabecular pattern (15). Solid pattern; neoplastic hepatocytes form a solid mass lack of sinusoids and is characterized by dense tumor cell aggregates (11,16). It is typically seen as a loss of the reticulin framework (14). Cirrhotic type is rarely seen (15). Prominent fibrosis is present along the sinusoidal cavities and at varying degrees of atrophy are seen in trabeculae formed by tumor cells (17). It can accompany any of the other patterns (14). Tumor cells in HCCs are generally polygonal, but may be cuboidal or columnar. It has thin granular eosinophilic cytoplasm. In well and moderately degree differentiated tumors, bile canaliculi are easily seen, but not in high-grade HCCs. An increase in the nucleus-cytoplasm ratio is observed. The nucleus is round-oval and contains a distinct nuclei and the nucleus membrane is irregular. Even though the intranuclear cytoplasmic invaginations are not a specific finding and they are commonly seen. Various cytoplasmic inclusions can be detected in tumor cells. Fat droplets occur in two-thirds of tumors. Diffuse accumulation of fat or glycogen causes the cytoplasm to appear transparent. Because of these changes, the tumor is called clear cell carcinoma. Mallory hyaline is present in approximately 20% of cases and refers to the clustering of intermediate filaments (18). Globular proteinous eosinophilic inclusions occur in 20% of cases. The light-colored inclusions, which are observed in 8% of cases, are called pale bodies and express fibrinogen accumulation. Copper binding

protein or copper was detected in 28% of HCCs and associated with the presence of bile in the tumor (13).

As previously reported, HCC (19-27) and cholangioadenocarcinoma (28) were induced by DEN administration. Histopathological alterations in these studies briefly; liver lobular structure disruption (21,22), trabecular structures formation (19), atypia in the cells (19,21,23,24), differences in the nucleus-cytoplasm ratio (23,24), hyperchromasia (20-22), megalocytosis and foam cytoplasm cell appearance (20), mitotic figures (20,22,23), tumor cells with granular cytoplasm (21,22) multi-nuclei bizarre giant cells (24), hyaline globules (21), apoptosis (20), bile duct proliferation (21) and inflammatory cell infiltration (21). Similar to these studies (19-27) we demonstrated that HCC was occurred in the DEN group however, the dominant histopathological pattern was a mixture containing trabecular and acinar structures. In tumor tissue; atypia, differences in nucleus/cytoplasm ratio, hyperchromasia, mitosis, fatty changes, hyaline droplets, pale bodies, wide hemorrhage areas surrounded by fibrous capsules, bile duct hyperplasia and clear cells were also observed. According to our data, DEN was found to be very useful in inducing an experimental liver cancer model especially HCC.

Recent studies show that Silymarin has a histopathologically protective effect against liver injury and cancer as a result of DEN administration (19-21,29,30). In DEN+Silymarin group similar to the DEN group, a mix pattern of trabecular and acinar structures of HCC was observed. In the histopathological examinations, atypia, hyperchromasia, mitosis and fatty changes were observed in the cells in the tumor area. In addition, hyaline droplets, pale bodies, wide areas of hemorrhage surrounded by fibrous capsules, bile duct hyperplasia and clear cells in the tumor area were also detected. In the light of these findings, we determined that Silymarin didn't show any anticarcinogenic effect in contrast to the literature data (19-21,29,30).

In conclusion, we thought that 20 weeks of DEN administration is very effective in inducing HCC. In addition, we revealed histopathologically in detail that Silimarin has no protective effect against DEN administration. We suggest that the gavage route should be preferred in order for Silimarin to have a stronger protective effect.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Medhat A., Mansour S., El-Sonbaty S., Kandil E., Mahmoud M., 2017. Evaluation of the antitumor activity of platinum nanoparticles in the treatment of hepatocellular carcinoma induced in rats. *Tumour Biol*, 39,1-10.
2. Elsayed MM., Mostafa ME., Alaaeldin E., Sarhan HA., Shaykoon MS., Allam S., Ahmed AR., Elsadek BE., 2019. Design and characterisation of novel sorafenib-loaded carbon nanotubes with distinct tumour-suppressive activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 14, 8445-8467.
3. Livingstone MC., Johnson NM., Roebuck BD., Kensler TW., Groopman JD., 2019. Serum miR-182 is a predictive biomarker for dichotomization of risk of hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Carcinog*, 58, 2017-2025.
4. Salama YA., El-Karef A., El Gayyar AM., Abdur-Rahman N., 2019. Beyond its antioxidant properties: Quercetin targets multiple signalling pathways in hepatocellular carcinoma in rats. *Life Sci*, 236, 116933.
5. Subramaniam N., Kannan PKA., Thiruvengadam D., 2019. Hepatoprotective effect of boldine against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 33, e22404.
6. Rawla P., Sunkara T., Muralidharan P., Raj JP., 2018. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*, 22, 141-150.
7. Fahmi A., Hassanen N., Abdur-Rahman M., Shams-Eldin E., 2019. Phytochemicals, antioxidant activity and hepatoprotective effect of ginger (*Zingiber officinale*) on diethylnitrosamine toxicity in rats. *Biomarkers*, 24, 436-447.
8. Moawed FS., El-Sonbaty SM., Mansour SZ., 2019. Gallium nanoparticles along with low-dose gamma radiation modulate TGF- β /MMP-9 expression in hepatocellular carcinogenesis in rats. *Tumour Biol*, 41, 1010428319834856.
9. Bosch-Barrera J., Menendez JA., 2015. Silibinin and STAT3: A natural way of targeting transcription factors for cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 41, 540-546.
10. Anwar S., Madkor HR., Ahmed N., Wagih ME., 2018. In vivo anticlastogenic effect of silymarin from milk thistle *Silybum marianum* L. *Indian J Pharmacol*, 50, 108-115.
11. Cullen JM., 2017. Tumors of the Liver and Gallbladder. In "Tumors in Domestic Animals", Ed., DJ Meuten, 5th ed., 602-622, Wiley Blackwell, Iowa.
12. Geller SA., Petrowic LM., 2009. Primary and Metastatic Malignant Tumors of the Liver. In "Biopsy Interpretation of the Liver", Ed., SA Geller, LM Petrowic, 2nd ed., 319-368, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
13. Washington K., Harris E., 2010. Masses of the Liver. In "Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology", Ed., SE Mills, 5th ed., 1536-1594, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
14. Ferrell L., Kakar S., 2013. Tumors of the Liver, Biliary Tree, and Gallbladder. In "Diagnostic Histopathology of Tumors: Vol 1", Ed., CDM Fletcher, 4th ed., 477-530, Elsevier Saunder, Philadelphia.
15. Hirohashi S., Ishak KG., Kojiro M., Wanless IR., Theise ND., Tsukuma H., Blum HE., Deugnier Y., Laurent Puig P., Fischer HP., Sakamoto M., 2000. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts. In "World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of

- the Digestive System", Ed., SR Hamilton, LA Aaltonen, 157-202, IARC Press, Lyon.
16. Salomao M., McMillen E., Lefkowitz JH., 2012. Recent advances in the classification of hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Histopathol*, 18, 37-45.
 17. Schlageter M., Terracciano LM., D'Angelo S., Sorrentino P., 2014. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 20, 15955-15964.
 18. Goodman ZD., Terracciano LM., Wee A., 2012. Tumours and tumour-like lesions of the liver. In "MacSween's Pathology of the Liver", Ed., AD Burt, BC Portmann, LD Ferrell, 761-851, 6th ed., Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh.
 19. Ramakrishnan G., Raghavendran HR., Vinodhkumar R., Devaki T., 2006. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact*, 161, 104-114.
 20. El Mesallamy HO., Metwally NS., Soliman MS., Ahmed KA., Abdel Moaty MM., 2011. The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int*, 11, 38.
 21. Hussain T., Siddiqui HH., Fareed S., Vijayakumar M., Rao CV., 2012. Evaluation of chemopreventive effect of Fumaria indica against N-nitrosodiethylamine and CCl₄-induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *Asian Pac J Trop Med*, 5, 623-629.
 22. Arul D., Subramanian P., 2013. Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 434, 203-209.
 23. Cui LM., Zhang K., DJ Ma., Liu SP., Zhang XW., 2014. Protein expression under sustained activation of signal transducer and activator of transcription-3 in diethylnitrosamine-induced rat liver carcinogenesis. *Oncol Lett*, 8, 608-614.
 24. Song S., Yuan P., Li P., Wu H., Lu J., Wei W., 2014. Dynamic analysis of tumor-associated immune cells in DEN-induced rat hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 22, 392-399.
 25. de Guadalupe Chavez-Lopez M., Perez-Carreón JI., Zuniga-Garcia V., Diaz-Chavez J., Herrera LA., Caro-Sanchez CH., Acuna-Macias I., Gariglio P., Hernandez-Gallegos E., Chiliquinga AJ., Camacho J., 2015. Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. *Tumour Biol*, 36, 6149-6158.
 26. Liu WH., Ren LN., Wang X., Wang T., Zhang N., Gao Y., Luo H., Navarro-Alvarez N., Tang LJ., 2015. Combination of exosomes and circulating micro RNAs may serve as a promising tumor marker complementary to alpha-fetoprotein for early-stage hepatocellular carcinoma diagnosis in rats. *J Cancer Res Clin Oncol*, 141, 1767-1778.
 27. Zuniga-Garcia V., Chavez-Lopez Mde G., Quintanar-Jurado V., Gabino-Lopez NB., Hernandez-Gallegos E., Soriano-Rosas J., Perez-Carreón JI., Camacho J., 2015. Differential Expression of Ion Channels and Transporters During Hepatocellular Carcinoma Development. *Dig Dis Sci*, 60, 2373-2383.
 28. Kadasa NM., Abdallah H., Afifi M., Gawayed S., 2015. Hepatoprotective effects of curcumin against diethyl nitrosamine induced hepatotoxicity in albino rats. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 103-108.
 29. Shaarawy SM., Tohamy AA., Elgendy SM., Elmageed ZY., Bahnasy A., Mohamed MS., Kandil E., Matrougui K., 2009. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci*, 5, 549-557.
 30. Linza A., Wills PJ., Ansil PN., Prabha SP., Nitha A., Latha B., Sheeba KO., Latha MS., 2013. Dose-response effects of *Elephantopus scaber* methanolic extract on N-nitrosodiethylamine-induced hepatotoxicity in rats. *Chin J Nat Med*, 11, 362-370.



Erzurum ve Çevresinde Üretilen Süt ve Süt Ürünlerinin Mevsimlere Göre Mineral Madde ve Ağır Metal İçeriği*

Korhan ÖZTURAN^{1a}, Mustafa ATASEVER^{2b}✉

1. Kara Kuvvetleri Komutanlığı, Ankara, TÜRKİYE.

2. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

ORCID: : 0000-0002 3914 2749^a, 0000-0002-1627-5565^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
04.11.2019	16.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Özturan K, Atasever M: Erzurum ve Çevresinde Üretilen Süt ve Süt Ürünlerinin Mevsimlere Göre Mineral Madde ve Ağır Metal İçeriği. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 15(1): 51-62, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.642505

Öz: Bu çalışmada Erzurum ili merkezi ve bazı ilçelerinde üretilen inek sütleri ve süt ürünlerinin dönemsel olarak mineral madde içeriği ve ağır metal kirlilik düzeyleri ve bu değerlerin bölgenin toprak ve bitki yapısından ne düzeyde etkilendiği ortaya konulmuştur. Alınan 335 adet inek sütü, 82 adet süt ürünü, 26 adet toprak ve 26 adet çayır-mera bitkisinde Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Pb, Ni ve Mn konsantrasyonları, İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. İncelenen inek sütü örneklerinde Ca miktarı 1258.48±350.76 mg/kg, Na miktarı 415.51±167.17 mg/kg, K miktarı 1768.58±461.64 mg/kg, Mg miktarı 107.33±31.19 mg/kg, Cu miktarı 0.079±0.103 mg/kg, Fe miktarı 0.64±3.45 mg/kg, Zn miktarı 1.406±0.751 mg/kg, Pb miktarı 0.031±0.048 mg/kg, Ni miktarı 0.034±0.273 mg/kg ve Mn miktarı 0.022±0.11 mg/kg düzeylerinde bulunmuştur. Erzurum ve yöresinde üretilen inek sütlerinde ulusal ve uluslararası değerlerle karşılaştırıldığında ağır metal açısından ileri düzeyde bir kirlilik olmadığı saptanmıştır. Bölge toprağında herhangi bir ağır metalle ileri düzeylerde kirlilik olmadığı belirlenmiştir. Süt örneklerinin dönemlere göre (yaz-kış) yapılan istatistiksel değerlendirmede Ca, Na, K, Cu ve Pb konsantrasyonlarında farklılık (P<0.01) olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağır Metaller, Bitkiler, Mineraller, Süt Ürünleri, Toprak Kirleticileri.

Mineral and Heavy Metal Contents of Milk and Milk Products Produced in Erzurum Province According to Seasons

Abstract: In this study, the mineral content and heavy metal pollution levels of cow's milk and dairy products produced in Erzurum province and some districts were determined and how much these levels are affected from soil and plant structure are introduced. Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Pb, Ni and Mn concentrations of samples taken from 335 cow milks, 82 milk products, 26 soils and 26 pasture-meadow plants are determined by using Inductive Couple Plasma Optic Emission Spectroscopy (ICP-OES). In the examined cow milk samples, 1258.48±350.76 mg/kg of Ca, 415.51±167.17 mg/kg of Na, 1768.58±461.64 mg/kg of K, 107.33±31.19 mg/kg of Mg, 0.079±0.103 mg/kg of Cu, 0.64±3.45 mg/kg of Fe, 1.406±0.751 mg/kg of Zn, 0.031±0.048 mg/kg of Pb, 0.034±0.273 mg/kg of Ni and 0.022±0.11 mg/kg of Mn were determined. When compared with national and international values, it was found that there is no advanced pollution in heavy milk produced in Erzurum and its region. It was determined that there is no heavy pollution with any heavy metal in the soil of the region. It was determined that the milk samples showed different concentrations of Ca, Na, K, Cu and Pb (P<0.01) in the statistical evaluation according to periods (summer and winter).

Keywords: Dairy Products, Heavy Metals, Minerals, Plants, Soil Pollutants.

✉ Mustafa Atasever

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

e-posta: atasever@atauni.edu.tr

*Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında yapılmış aynı isimli doktora tezinden alınmıştır.

GİRİŞ

Hızlı kentleşmenin ve endüstriyel gelişmenin bir sonucu olarak dünyada yaygın görülen ağır metal kontaminasyonuna ilişkin çevresel kirlilik, gıda zinciri yoluyla halk sağlığını tehdit eder boyutlara gelmiştir (1). Türkiye’de de sanayileşme ve kentleşmenin yaygınlaşmasının bir sonucu olarak toprak, su ve hava kaynaklarında kirlilik problemiyle sıklıkla karşılaşılmaktadır.

Çevre ve gıda kirlenmesine neden olan binlerce kimyasal madde artıkları arasında, doğaya yayılmış bulunan her türlü metal kalıntılarının önemli bir payı vardır. Biyolojik sistemlerde çevresel kontaminant olarak bilinen metalik kirleticilerin düzeyi, kontaminasyonun yoğun olduğu bölgelerde yaşayan hayvanlarda ve yetişen bitkilerde yüksek boyutlara ulaşmaktadır. Bu durum gıda zinciri boyunca giderek artan düzeylerde birikerek zincirin son halkasında bulunan insanlara ulaşmaktadır. Böylece gıda yolu ile bu tür kontaminantlarla karşı karşıya kalan bireyler, akut toksik etki ya da uzun süreli alımlarla kronik geri dönüşsüz sağlık problemleri ile karşılaşmaktadırlar (2). Besin kaynaklı ağır metal zehirlenmelerinde çocuklar yetişkinlere göre daha duyarlıdır.

Süt ve ürünlerindeki ağır metal kontaminasyonu; sağım hayvanlarının maruz kaldığı bulaşmaya bağlı olarak hammaddeden veya üretim ve depolama sırasında süt ürünleri ile temas eden makine ve ekipmanlardan kaynaklanan bulaşmalardan ileri gelmektedir.

Teknolojik işlemler sırasında veya süt ve ürünlerinin muhafaza edilmesinde kullanılan metal kaplardan ve işletme suyundan kaynaklanan metalik kontaminasyondaki başlıca elementler alüminyum, bakır, çinko, demir, kalay, kurşun, arsenik, kadmiyum gibi metallerdir (3).

Ağır metaller atmosferden kuru veya ıslak çökeltme yoluyla, kirli sular ve arıtma çamuru uygulamalarıyla, katı atıklarla, bazı pestisit türleriyle ve fosfatlı gübrelerle topraklarda birikmekte; ortam koşullarına bağlı olarak flora ve fauna bünyesine geçerek besin zincirinde üst basamaklara kadar transfer olmaktadır. Ağır metallerin topraktaki biyolojik prosesler üzerine toksik etkisi; onların mobiliteleri, topraktaki konsantrasyonları, ana materyalin kimyasal bileşimi ve bileşimin çözünürlüğüne bağlıdır. Söz konusu ağır metallerin topraktaki yüksek konsantrasyonları özellikle kültür topraklarında gübreleme, bitki gelişimi ve ürün üzerine olumsuz etkiler yapmaktadır (4).

Bu çalışmada;

Erzurum ve çevresinde üretilen inek sütleri ve süt ürünlerindeki ağır metal ve mineral madde düzeylerini incelemek, kontaminasyon miktarları ve bunların sebeplerini tespit etmek, Süt ve ürünlerinin ağır metal ve mineral madde içeriğine mevsimsel değişiklikler ile ilçeler arası farklılıkları belirlemek, Süt ve ürünleri toplanan merkezlerden toprak ve çayır bitkisi örnekleri de alarak, toprağın ve

bitkilerin süt ve ürünlerinin ağır metal ve mineral madde içeriğine etkilerini saptamak amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada materyal olarak 335 adet çiğ inek sütü, 82 adet süt ürünü ve yöreye ait 26 adet toprak ve 26 adet çayır bitkisi örnekleri kullanılmıştır. Örnekler Erzurum merkezi ve 6 bölgesi olmak üzere toplam 7 merkezden elde edilmiştir. Sütler ve süt ürünleri kış (I. dönem) ve yaz (II.dönem) aylarında alınmıştır. Toprak ve bitki numuneleri toprağın tav olduğu Mayıs-Haziran aylarında toprak için 0-20 cm derinlikten TS 9923 (5) ve TS 10309 (6)'e göre alınmıştır. Çalışmanın toprak ve bitki numunelerinin örnek hazırlama ve çözümleme işlemleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü laboratuvarlarında, diğer örnekler ve tüm işlemler ise 9'uncu Kolordu A Tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı laboratuvarlarında yapılmıştır.

Örneklerin muhafazasında ve işlenmesinde kullanılan tüm malzemeler, Jorherm (7)'in önerdiği şekilde yıkama işlemine tabi tutularak hazırlanmıştır. Analizi yapılacak süt ve ürünleri örneklerinde organik bileşikler yok etmek ve inorganik bileşikler de çözünür faza geçirmek amacıyla yapılan çözümleme işlemleri kapalı sistem yaş yakma metodu kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Ethos Touch Control (Milestone) mikrodalga çözümleme sistemi ve aksesuarları (tetraflorometoksil (TFM) kaplar ile Microwave Digestion Rotor (MDR) 1000/10 yüksek basınç rotorları ve basınç-sıcaklık kontrol sensörleri) kullanılmıştır. Örneklerin çözülmesinde %65'lik nitrik asit (Merck, 1.00452.2500) ve %30'luk hidrojen peroksit (Merck, 1.08597.1000) kombinasyonu kullanılmıştır. Toprak ve bitki numunelerinin çözümlendirilmesinde DTPA yöntemi (8,9) kullanılmış ve laboratuvarında ön işlemlerden geçirildikten sonra ICP-OES cihazıyla okunmak suretiyle mineral madde ve ağır metal düzeyleri belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanılmıştır. Toprak, bitki, süt ve ürünleri örneklerinde ilçeler arasındaki mineral içeriğine bağlı farklılıkları tespit edebilmek için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, dönemsel farklılıkları tespit edebilmek için ise t- testi yapılmıştır.

BULGULAR

Erzurum ve bazı ilçelerinden temin edilen toprak ve çayır bitkisi, inek sütleri ve süt ürünleri örneklerinin mineral madde ve ağır metal düzeyleri Tablo 1-5'de verilmiştir.

Tablo 1. Toprak örneklerinin alınan merkezlere göre ortalama mineral madde ve ağır metal içeriği (mg/kg).**Table 1.** The Average mineral and heavy metal content of soil samples according to the regions (mg/kg).

Merkez	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Zn	Pb	Ni	Mn
Çat	5939.50±296.28	660.90±564.4 ^a	384.60±128.69	1187.50±109.60	1.33±0.11	0.26±0.12	0.52±0.05 ^b	0.00±0.00	1.33±0.01	3.53±0.80
Dumlu	6651.78±1893.79	179.99±160.49 ^b	691.91±494.91	1086.29±487.81	1.83±0.73	3.20±4.79	0.98±0.36 ^b	0.20±0.59	3.59±2.53	7.59±3.20
Erzurum	7296.75±4132.97	47.93±45.51 ^b	588.58±304.69	912.10±356.15	2.04±0.48	2.61±3.08	0.61±0.46 ^b	0.29±0.37	2.74±1.14	12.54±7.38
Ilica	6537.75±1719.35	53.63±35.37 ^b	596.80±313.24	1016.20±703.20	2.02±0.37	2.21±1.95	2.35±1.82 ^{ab}	0.06±0.11	2.98±0.90	18.08±17.07
Narman	10185.50±4517.71	163.40±18.24 ^b	1689.75±1093.54	1401.50±89.80	1.41±0.26	0.92±0.37	3.74±3.50 ^a	0.13±0.18	2.94±0.87	30.64±31.02
Pasinler	5901.33±3929.77	179.10±188.51 ^b	1211.67±575.92	805.50±335.09	1.86±0.43	3.00±2.17	2.15±0.84 ^{ab}	0.81±0.81	2.68±0.49	8.48±2.46
Tortum	12045.00±77.78	110.79±62.95 ^b	744.65±203.15	1167.00±100.41	1.74±0.26	0.51±0.12	0.84±0.22 ^b	0.28±0.07	2.99±0.64	5.84±2.11
F Değeri	1.747	3.136*	2.050	0.459	0.625	0.377	2.809*	0.889	0.497	1.911
Ortalama	7278.77±2949.85	170.52±220.36 b	778.53±541.46	1054.55±429.23	1.82±0.53	2.33±3.23	1.43±1.38	0.25±0.48	2.99±1.65	11.39±11.60

*: P<0.05 a,b: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistik açıdan önemli fark vardır. Ca: Kalsiyum, Na:Sodyum, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Zn: Çinko, Pb:Kurşun, Ni:Nikel, Mn:Mangan.

Tablo 2. Bitki örneklerinin alınan merkezlere göre ortalama mineral madde ve ağır metal içeriği (mg/kg).**Table 2.** The Average mineral and heavy metal content of the plant samples according to the regions (mg/kg).

Merkez	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Zn	Pb	Ni	Mn
Çat	5830.95±1683.83	443.08±504.03	29651.50±306.18	2862.5±711.35 ^{ab}	20.39±7.72	405.71±167.74	35.56±6.52	0.30±0.11	2.069±0.153	13.41±2.49
Dumlu	7547.71±3659.03	1701.28±4002.88	25283.33±6172.52	2772.95±1106.83 ^{ab}	17.70±2.96	1567.17±1201.20	54.20±26.02	0.94±0.83	1.466±0.511	23.52±16.40
Erzurum	7010.60±1846.11	595.28±716.79	31148.50±10364.96	1674.48±503.78 ^b	18.30±2.03	659.50±394.18	41.71±16.29	0.44±0.09	1.198±0.410	21.60±6.10
Ilica	15437.75±11897.64	174.14±139.24	30954.25±4933.25	4517.28±2132.05 ^a	18.27±4.80	669.70±391.86	34.13±8.73	0.44±0.05	1.586±0.713	18.41±8.88
Narman	12697.30±13588.75	325.78±228.47	21978.50±16193.45	1125.15±809.21 ^b	17.04±6.23	431.89±171.59	35.73±24.80	0.15±0.11	1.077±0.361	26.93±8.48
Pasinler	3006.50±1915.99	688.31±465.18	21471.00±5575.13	1658.69±859.15 ^b	11.97±2.62	959.23±1379.43	27.34±5.77	0.80±1.09	1.063±0.362	16.35±13.96
Tortum	16469.00±842.87	299.75±63.51	29057.50±497.10	1461.6±131.38 ^b	20.57±2.84	559.02±68.58	40.65±5.84	0.21±0.17	1.434±0.169	19.18±1.08
F Değeri	2.005	0.247	0.997	3.3*	1.546	1.068	1.054	0.885	1.240	0.364
Ortalama	9105.26±6941.48	868.90±2372.27	26990.35±7341.42	2523.00±1481.04	17.59±4.02	965.09±934.82	42.19±19.59	0.61±0.64	1.410±0.504	20.76±11.51

*: P<0.05 a,b: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistik açıdan önemli fark vardır. Ca: Kalsiyum, Na:Sodyum, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Zn: Çinko, Pb:Kurşun, Ni:Nikel, Mn:Mangan.

Tablo 3. Erzurum ve ilçelerinden alınan süt örneklerinin ortalama mineral madde ve ağır metal içeriği (mg/kg).**Table 3.** Mineral and heavy metal content of milk samples taken from Erzurum and its districts (mg / kg).

Merkez	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Zn	Pb	Ni	Mn
Çat	1364.38±291.89 ^a	416.83±107.65 ^{abc}	1687.28±292.06 ^a	108.84±22.93 ^{ab}	0.057±0.048 ^b	0.585±0.866	1.367±0.498	0.022±0.022 ^b	0.008±0.009	0.010±0.005
Dumlu	1202.83±30.8 ^a	398.26±172.20 ^{bc}	1742.02±423.96 ^a	105.72±34.8 ^{ab}	0.056±0.074 ^b	0.497±0.790	1.342±0.563	0.025±0.037 ^b	0.017±0.050	0.020±0.047
Erzurum	1354.42±39.88 ^a	487.16±189.85 ^a	1913.51±581.8 ^a	116.71±31.79 ^a	0.124±0.148 ^a	0.421±0.815	1.425±0.466	0.051±0.072 ^a	0.026±0.065	0.016±0.028
İllica	1230.40±365.9 ^a	355.17±119.56 ^{bc}	1723.64±388.0 ^a	100.57±31.85 ^{bc}	0.062±0.08 ^a	1.653±8.805	1.523±1.308	0.015±0.026 ^b	0.116±0.700	0.055±0.276
Narman	1190.78±230.08 ^a	339.42±80.75 ^c	1723.21±422.49 ^a	100.54±27.92 ^{bc}	0.086±0.066 ^{ab}	0.376±0.460	1.486±0.354	0.035±0.032 ^{ab}	0.010±0.008	0.012±0.015
Pasinler	1325.31±331.18 ^a	433.05±174.34 ^{ab}	1811.36±303.07 ^a	111.13±22.09 ^{ab}	0.055±0.064 ^b	0.428±0.546	1.491±0.901	0.016±0.025 ^b	0.015±0.033	0.012±0.015
Tortum	991.45±349.77 ^b	384.06±155.65 ^{bc}	1401.59±336.01 ^b	90.02±29.72 ^c	0.053±0.083 ^b	0.672±1.575	1.035±0.852	0.022±0.035 ^b	0.037±0.128	0.022±0.058
F Değeri	4.821**	6.022**	4.589**	3.573**	4.947**	0.849	1.408	5.160**	0.895	0.915
Ortalama	1258.48±350.76	415.51±167.17	1768.58±461.64	107.33±31.19	0.079±0.103	0.64±3.45	1.406±0.751	0.031±0.048	0.034±0.273	0.022±0.11

** : P<0.01 a,b,c : Aynı sütündeki farklı harfler arasında istatistikî açıdan önemli fark vardır. Ca: Kalsiyum, Na:Sodyum, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Zn: Çinko, Pb:Kurşun, Ni:Nikel, Mn:Mangan.

Tablo 4. Süt ve süt ürünleri örneklerinin ortalama mineral madde ve ağır metal içeriği (mg/kg).**Table 4.** The Mineral and heavy metal content of milk and milk samples (mg/kg).

Ürün	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Zn	Pb	Ni	Mn
Süt	1258.48±350.76 ^c	415.51±167.17 ^c	1768.58±461.64 ^a	107.33±31.19 ^c	0.079±0.103 ^b	0.64±3.45	1.406±0.751 ^b	0.031±0.048 ^b	0.034±0.273	0.022±0.11
Beyaz Peynir	4919.27±1382.11 ^a	13204.53±1371.52 ^a	1565.40±238.18 ^a	199.12±29.27 ^a	0.153±0.090 ^a	0.751±0.306	7.023±2.798 ^a	0.035±0.032 ^b	0.032±0.013	0.035±0.022
Yoğurt	1777.00±248.59 ^b	653.82±176.31 ^b	1777.74±619.62 ^a	168.00±27.34 ^b	0.095±0.051 ^b	0.297±0.176	1.394±0.636 ^b	0.020±0.023 ^b	0.011±0.008	0.010±0.009
Tereyağı	173.41±74.57 ^d	93.33±48.86 ^d	213.09±71.93 ^b	17.53±9.95 ^d	0.101±0.097 ^b	0.447±0.353	0.461±0.522 ^c	0.072±0.075 ^a	0.028±0.030	0.011±0.010
F Değeri	575.441**	9677.249**	82.905**	193.244**	5.324**	0.153	290.670**	5.932**	0.081	0.403
Ortalama	1501.9±1106.9	1335.73±3333.43	1672.56±569.02	113.56±46.46	0.087±0.101	0.613±3.096	1.760±1.799	0.032±0.049	0.032±0.245	0.021±0.099

** : P<0.01 a,b,c,d : Aynı sütündeki farklı harfler arasında istatistikî açıdan önemli fark vardır. Ca: Kalsiyum, Na:Sodyum, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Zn: Çinko, Pb:Kurşun, Ni:Nikel, Mn:Mangan.

Tablo 5. Süt ve ürünlerinde dönemlere göre mineral madde ve ağır metal içeriği (mg/kg).**Table 5.** Mineral and heavy metal content of milk and milk products by periods (mg/kg).

Mineral Madde	Dönem	Süt		Beyaz Peynir		Yoğurt		Tereyağı	
		Ortalama±Standart sapma	t	Ortalama±Standart sapma	t	Ortalama±Standart sapma	t	Ortalama±Standart sapma	t
Ca	I.Dönem	1403.627±367.155	28.05**	6087.733±561.986	1.12	1829.467±273.520	0.39	184.003±33.922	2.84
	II.Dönem	1081.615±228.378		3750.800±845.813		1724.533±217.485		159.686±100.596	
Na	I.Dönem	493.888±177.323	24.32**	13288.667±1520.007	0.24	562.753±55.923	7.02*	98.750±17.185	3.99
	II.Dönem	320.001±84.541		13120.400±1253.347		744.893±208.547		87.882±68.430	
K	I.Dönem	1869.484±517.424	16.02**	1534.000±284.701	0.52	1336.416±241.623	9.52**	214.672±49.659	3.66
	II.Dönem	1645.632±346.688		1596.800±185.332		2219.067±565.288		210.038±92.745	
Mg	I.Dönem	119.450±28.814	0.31	208.100±23.913	0.62	165.269±18.057	1.65	17.997±4.269	3.52
	II.Dönem	92.551±27.454		190.141±32.103		170.739±34.726		17.165±13.823	
Cu	I.Dönem	0.114±0.124	97.29**	0.230±0.042	0.06	0.109±0.029	3.04	0.164±0.088	0.71
	II.Dönem	0.037±0.043		0.076±0.047		0.080±0.065		0.049±0.073	
Fe	I.Dönem	0.778±4.590	1.57	0.848±0.321	0.46	0.219±0.117	3.24	0.407±0.235	4.93*
	II.Dönem	0.471±0.868		0.655±0.266		0.376±0.194		0.505±0.447	
Zn	I.Dönem	1.258±0.833	2.81	8.842±2.536	1.05	1.615±0.505	1.48	0.550±0.670	0.47
	II.Dönem	1.528±0.654		5.203±1.640		1.174±0.693		0.395±0.392	
Pb	I.Dönem	0.044±0.060	70.41**	0.048±0.039	8.87**	0.010±0.020	2.04	0.093±0.096	4.76*
	II.Dönem	0.014±0.020		0.021±0.012		0.029±0.022		0.058±0.050	
Ni	I.Dönem	0.048±0.364	2.19	0.035±0.012	0.15	0.011±0.008	0.01	0.028±0.029	0.01
	II.Dönem	0.017±0.061		0.029±0.014		0.011±0.008		0.029±0.034	
Mn	I.Dönem	0.024±0.143	0.24	0.037±0.026	1.22	0.009±0.006	2.95	0.011±0.009	0.40
	II.Dönem	0.019±0.044		0.033±0.019		0.011±0.011		0.012±0.011	

*: P<0.05 ***: P<0.01. Ca: Kalsiyum, Na: Sodyum, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Zn: Çinko, Pb: Kurşun, Ni: Nikel, Mn: Mangan.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Toprak örneklerinde yapılan analizler neticesinde elde edilen Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Pb, Ni ve Mn ortalamaları sırasıyla; 7278.77±2949.85, 170.52±220.36, 778.53±541.4, 1054.55±429.23, 1.82±0.53, 2.33±3.23, 1.43±1.38, 0.25±0.48, 2.99±1.65, 11.39±11.60 mg/kg olarak; bitki örneklerinde ise bu değerler sırasıyla; 9105.26±6941.48, 868.90±2372.27, 26990.35±7341.42, 2123.00±1481.04, 17.59±4.02, 965.09±934.82, 42.19±19.59, 0.61±0.64, 1.41±0.50, 20.76±11.51 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu değerler Brohi ve ark. (10) nın belirttiği bitki değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Erzurum yöresinde incelenen inek sütlerindeki mineral maddelerden Ca miktarının 1258.48±350.76 mg/kg ortalamaya sahip olduğu görülmektedir. Mevsimsel değişimlerin sütün Ca içeriğini önemli derecede etkilediği, buna göre yaz aylarında kışa nazaran Ca değerinde önemli derecede azalma olduğu görülmektedir. Ayrıca bölgeler arası farklılık da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Araştırmada beyaz peynirdeki ortalama Ca değeri 4919.27±1382.11 mg/kg'dır. Bu değer süt, yoğurt ve tereyağı ile karşılaştırıldığında, ürünler arası farklılığın istatistiksel değerlendirilmesinde önemli çıkmıştır (P<0.01). Yoğurt ve tereyağındaki ortalama Ca miktarları ise sırasıyla 1777.00±248.59 mg/kg ve 173.41±74.57 mg/kg'dır.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütlerindeki Na ortalaması 415.51±167.17 mg/kg'dır. Na değeri beyaz peynir, yoğurt ve tereyağında ise sırasıyla 13204.53±1371.52 mg/kg, 653.82±176.31 mg/kg ve 93.33±48.86 mg/kg olduğu saptanmıştır. Mevsimsel değişimlerin sütün Na içeriğini çok önemli derecede etkilediği, yaz ayları döneminde Na değerinde önemli derecede azalma olduğu görülmüştür.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütlerindeki K ortalaması 1768.58±461.64 mg/kg'dır. Sütün K içeriğinin yaz ayları döneminde önemli derecede düştüğü saptanmıştır. Ayrıca ilçeler arası farklılık da istatistiksel açıdan önemlidir. Bu araştırmada beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı K içeriği sırasıyla 1565.40±238.18 mg/kg, 1777.74±619.62 mg/kg, 213.09±71.93 mg/kg'dır.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Mg ortalaması sırasıyla 107.33±31.19 mg/kg, 199.12±29.27 mg/kg'dır, 168.00±27.34 mg/kg, 17.53±9.95 mg/kg'dır.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Cu ortalaması sırasıyla 0.079±0.103 mg/kg, 0.153±0.090 mg/kg, 0.095±0.051 mg/kg ve 0.101±0.097 mg/kg'dır. Mevsimsel değişimlerin sütün Cu içeriğini çok önemli derecede etkilediği, kış aylarındaki değerler yaz aylarına göre oldukça fazla bir seviyede olduğu saptanmıştır. Kış mevsiminde tüketilen yemlerde bakır düzeyinin daha yüksek olduğu ve kışın elde edilen sütlerin yaz sütlerine nazaran daha fazla bakır içerdiği bilinmektedir (11) Cu yönünden ilçeler arası farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Süt örneklerinin Cu miktarlarındaki bölgesel farklılıklar incelendiğinde; Cu miktarının en fazla Erzurum merkezde olduğu belirlenmiştir. Bu durum sanayi kuruluşları ve otoyolların bu bölgede daha yoğun olmasından kaynaklanmış olabilir. Araştırmada elde edilen Cu değeri, Tripathi ve ark. (12) ve Rodriguez ve ark. (13)'nin tespit ettiği Cu değerlerine yakın, Gültekin (14)'nin Bursa ili ve çevresinde 3 farklı bölgede (trafik yoğunluklu bölge, sanayi bölgesi ve kırsal alan) tespit ettiği (0.58, 0.96, 0.39 mg/kg) değerlerden düşüktür. Bölgede sütçülükte artık bakır kaplar yerine genellikle paslanmaz çelik kapların kullanılıyor olması düşük Cu miktarının sebeplerinden birisidir.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütlerindeki Fe ortalaması 0.640 ± 3.450 mg/kg'dır. Yaz ve kış mevsiminde hayvan beslemede kullanılan yem türünün sütün metal içeriğine etki ettiği belirtilmiştir. Özellikle Pb, Fe, Cu ve Zn düzeyinin kışlık yemlerde daha yüksek olduğu dolayısıyla bu artışın kış sütlerine de yansıdığı bildirilmiştir (15). Araştırmada belirlenen Fe değeri; birçok araştırmacının (14,16-18) tespit ettiği değerlerden düşük, Lante ve ark. (19) ve Lindmark-Mansson ve ark. (20)'in bildirdiği miktarlardan fazladır. Araştırmada beyaz peynirde tespit edilen ortalama Fe değeri 0.751 ± 0.306 mg/kg'dır. Elde edilen bu Fe değeri birçok araştırmacının (18,21-24) bildirdikleri Fe değerlerinden düşüktür. Bu durum Erzurum bölgesinde trafik yoğunluğunun ve sanayinin diğer birçok bölgeye göre daha düşük düzeylerde olmasıyla alakalı olabilir. Araştırmada yoğurttaki ortalama Fe değeri 0.297 ± 0.176 mg/kg bulunmuştur. Bu değer Güler (17), Musaiger ve ark. (25) ve Sanchez-Segarra ve ark. (26)'nın yoğurtta tespit ettikleri Fe değerlerinden düşüktür. Tereyağındaki ortalama Fe değeri 0.447 ± 0.353 mg/kg'dır. Bu miktar Szefer (27)'in tereyağında bulunduğu Fe değerinden düşüktür. Sütteki Fe ve Cu düzeyinin yüksek olması, süt yağının oksidasyonunu artırmakta ve ürünlerde tat ve aroma bozukluklarına neden olabilmektedir.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Zn ortalaması sırasıyla 1.406 ± 0.751 mg/kg, 7.023 ± 2.798 mg/kg, 1.394 ± 0.636 mg/kg ve 0.461 ± 0.522 mg/kg'dır. Zn, DNA ve RNA sentezinde dolayısıyla protein sentezinde rol almakta ve özellikle hücre yenilenmesi, dokuların gelişmesi ve onarılmasında önemli bir yer tutmaktadır (15,28). Bu araştırmada elde edilen Zn değeri birçok araştırmacının (29-32) bildirdiği değerlerden daha düşüktür.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Pb ortalaması

sırasıyla 0.031 ± 0.048 mg/kg, 0.035 ± 0.032 mg/kg, 0.020 ± 0.023 mg/kg ve 0.072 ± 0.075 mg/kg'dır. Bu sonuçlar sütlerde az da olsa Pb kirliliği olduğunu göstermektedir. Mevsimsel değişimlerin sütün Pb içeriğini çok önemli derecede etkilediği, kış aylarındaki (0.044 ± 0.060) değer yaz aylarına (0.014 ± 0.020) göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu araştırmada Mayıs ayında toprak ve bitki örneklerinde bulunan Pb seviyesinin düşük seviyelerde bulunduğu göz önüne alındığında, sütün yaz ayları ortalama değerinin düşük seviyelerde tespit edilmesi normaldir. Kış aylarında tespit edilen yüksek Pb miktarının sebebi olarak; Erzurum'da soba ve kaloriferlerin yanma sürelerinin uzun olması, kullanılan kömür miktarının fazla ve kalitesiz olması, kış mevsiminde Pb içeriğinin yüksek çıkmasına neden olarak söylenebilir. Diğer bir sebep de trafikten kaynaklanan kontaminasyonlardır. Zira çevredeki en önemli Pb kaynaklarından biri de benzine katılan tetraetil kurşun veya tetrametil kurşundur. Benzine katılan bu bileşikler yanma sonucu egzoz gazları ile havaya çeşitli kurşun bileşikleri halinde yayılırlar (33). Buradan da toprağa ve bitkiye aktarılan bu bileşikler, hem solunum hem de beslenme yoluyla vücuda alınmış olurlar (34). Ayrıca mevsimsel değişimin ve beslemede kullanılan yemin sütlerin Pb içeriklerine etki edeceği düşünülmektedir. Özellikle Pb, Fe, Cu ve Zn düzeylerinin kışlık yemlerde yüksek olduğu, dolayısıyla bu artışın kışlık sütlerde de gözlendiği bildirilmiştir (11). Pb yönünden ilçeler arası farklılıkta istatistiksel açıdan önemlidir. Süt örneklerinin Pb miktarlarındaki bölgesel değerleri incelendiğinde; Pb miktarının en fazla Erzurum merkezde (0.051 ± 0.072 mg/kg) olduğu görülmektedir. Erzurum merkez ve civarının, kışın kullanılan yakıtlar ve daha yoğun trafiği nedeniyle Pb miktarı bu bölgeden alınan örneklerde fazla çıkmıştır. Araştırmada elde edilen Pb değeri; birçok araştırmada (18,35-37) bildirilen

değerlerden fazla ve bazı araştırmacıların (24,38-40) tespit ettiği miktarlardan düşüktür. Rubio ve ark. (41) yaptıkları çalışmada 3 ile 7 yaşlarındaki inek sütlerindeki Pb değerini yaşa göre karşılaştırmışlardır. Sadece 7 yaşındaki hayvanların sütlerinde belirlenen Pb miktarı bu çalışmaya nazaran daha yüksek bulunmuştur. Bunun da Pb'nin kemiklerde birikmesinden ve yaşın ilerlemesiyle vücutta tutulma konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Ni ortalaması sırasıyla 0.034 ± 0.0273 mg/kg, değeri 0.032 ± 0.013 mg/kg, 0.011 ± 0.008 mg/kg ve 0.028 ± 0.030 mg/kg'dır. Araştırmada elde edilen Ni değeri birçok araştırmacının (31, 40, 42-44) elde ettiği değerden düşüktür.

Erzurum ve yöresinden alınan inek sütü, beyaz peynir, yoğurt ve tereyağı Mn ortalaması sırasıyla 0.022 ± 0.110 mg/kg, 0.035 ± 0.022 mg/kg, 0.010 ± 0.009 mg/kg ve 0.011 ± 0.010 mg/kg'dır. Araştırmada elde edilen Mn değeri diğer bazı çalışmalara (21, 27, 45, 46) nazaran daha düşüktür.

Sonuç olarak; Erzurum bölgesinde üretilen süt ve ürünlerinin mineral madde açısından bölgenin toprak ve bitki yapısı da dikkate alındığında iyi bir seviyede olduğu görülmüştür. Bölgenin toprak ve bitki yapısıyla uyumlu olarak süt ve ürünlerinin ağır metal kirlilik düzeyinin de alt seviyelerde olduğu ortaya konulmuştur. Süt sanayinde kullanılan alet ve ekipmanlar, metalik kontaminasyon açısından büyük önem taşımaktadır. Makine, ekipman ve diğer süt kapları uygun metallere üretilmelidir. Kullanılan metallerin sert olması, darbelerden kolayca zarar görmemesi, tuz, asit ve alkalilere karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Kolay temizlenebilir nitelikte olması süt sanayii için oldukça önemlidir. Paslanmaz çelik malzeme, süt sanayii için uygun materyal olarak bilinmektedir. Günümüzde gıda

maddeleri üretimi bölgesel ya da ulusal düzeyde yapılmasına karşılık, tüketimi uluslararası boyuta taşınmıştır. Bu durum ise gıda maddelerinin daha sağlıklı ve güvenilir bir şekilde üretilmesinin, işlenmesinin, tüketime sunulmasının ve kontrolünün önemini artırmaktadır. Vücuda alınan metalik unsurların taşıdığı riskler göz önüne alındığında, bu olumsuz faktörlerin minimum düzeye indirilebilmesi için süt ve ürünlerinin üretimi sırasında uygulanan tüm teknolojik işlemlerin tekniğine göre yapılması; tüketime sunuluncaya kadar uygun koşullarda ve ambalajlarda saklanması gerekmektedir. Gıda maddelerindeki kontaminasyon kaynağı hakkında bilgi edinmek ve oluş şeklini belirlemek için üretim prosesinde kontrolün kaçınılmaz olduğu ve ancak bu yolla hedeflenen ürün kalitesine ulaşılabileceği asla gözardı edilmemeli, süt ve ürünlerinin gıda maddeleri içerisinde üretimden tüketimine kadar olan tüm safhalarında kontaminasyona açık olduğu unutulmamalıdır. Süt ve ürünlerinin ağır metallerle kontaminasyonu halk sağlığı açısından çok önemlidir. Süt ürünleri sıklıkla tüketilmesi nedeniyle, ağır metal içermesi durumunda, çeşitli hastalıkların ve lezyonların yaygınlığının nedeni olabilir. Besin zincirine ve dolayısıyla süte de kontamine olan ağır metallerin özellikle endüstri ve tarımdan kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Ağır metallerin insanlara olumsuz etkilerinden kaçınmak ve süt ve ürünlerinin kalitesini artırmak için süt üretilen alanlarda çevre kirliliğinin önlenmesi önemlidir. Meralar ve tarım alanları endüstri ve sanayi alanlarından uzak olmalıdır. Gıda ambalajı olarak kullanılan malzemeler, insan sağlığı açısından zararsız olmalıdır. Genel halk sağlığı açısından da çevre kirliliği hususunda etkin duyarlılığa ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Şimşek O., Gültekin R., Öksüz O., Kurultay S., 2000. The effect of environmental pollution on the heavy metal content of raw milk. *Nahrung*, 44, 360-363.
2. Erdiñç BD., 1998. Bazı gıdalarımızda metalik kontaminant düzeylerinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Türkiye.
3. Metin M., 2001. Süt Teknolojisi. Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Basımevi, Yayın No, 33, İzmir.
4. Karaca A., Turgay O., Kızılkaya R., Haktanır K., 1996. Topraklara ağır metal ilavesinin bazı biyolojik olaylara etkisi. Tarım ve Çevre İlişkiler Sempozyumu, Mersin, 111-121.
5. TS 1992. TS 9923. Toprak kalitesi – Yüzeysel topraktan numune alma, numunelerin taşınma ve muhafaza kuralları. UDK 624.131.36.
6. TS 2006. TS10309. Toprak kalitesi – Partikül büyüklüğü analizi ve toprak sabitelerinin tayini için toprak numunelerinin hazırlanması – Islak hazırlama metodu. ICS 13.080.05;13.080.20.
7. Jorherm L., 1993. Determination of metals in food stuffs by using atomic absorption spectrophotometry after dry ashing. NMKLI interlaboratory study of lead, cadmium, zinc, copper, iron, chromium and nickel. *J AOAC Int*, 76,798-813.
8. Lindsay WL., Norwell WA., 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper, *Soil Sci Soc Am J*, 421-423.
9. TS 2004. TS ISO 14870. Toprak kalitesi – Tamponlanmış DTPA çözeltisi yardımıyla eser elementlerin özütlenmesi, ICS 13.080.10.
10. Brohi AR., Aydeniz A., Karaman MR., Erşahin S., 1994. Bitki Besleme. GOP Üniversitesi Ziraat Fak Yay.4, Tokat.
11. Coni E., Bocca A., Lanni D., Caroli S., 1995. Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element contents of milk and dairy products. *Food Chemistry*, 52,123-130.
12. Tripathi RM., Raghuanth R., Sastry VN., Krishnamoorthy TM., 1999. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *Sci Total Environ*, 227, 229-235.
13. Rodriguez EMR., Alaejos MS., Romero CD., 2001. Mineral concentrations in cow's milk from the Canary Island. *J Food Comp and Analysis*. 14, 419-430.
14. Gültekin R., 1998. Bursa ili çevresinde alınan çiğ süt örneklerinde bazı mineral madde ve ağır metallerin tespiti üzerine bir araştırma. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.
15. IDF 1992. Trace Elements In Milk And Milk Products. *Int Dairy Fed Bul No*,278.
16. Garcia MIH., Puerto PP., Baquero MF., Rodriguez ER., Martin JD., Romero CD., 2006. Mineral and trace element concentrations of dairy products from goats' milk produced in Tenerife (Canary Island). *Int Dairy J*, 16, 182-185.
17. Güler Z., 2007. Levels of 24 minerals in local goat milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yoğurt). *Small Ruminant Res*, 71, 130-137.
18. Laçın A., 2005. Kahramanmaraş bölgesinde keçi sütünde eser element analizi. Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.
19. Lante A., Lomolino G., Cagnin M., Spettoli P., 2006. Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP-OES. *Food Cont*, 17, 229-233.
20. Lindmark-Mansson H., Fonden R., Petterson HE., 2003. Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J*, 13, 409-425.

21. Cichoscki AJ., Valduga E., Valduga AT., Tornadizo ME., Fresno JM., 2002. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control*, 13, 329-336.
22. Durmaz H., Tarakçı Z., Sagun E., Sancak H., 2006. Effect Ripening Time on Mineral Contents of Herby Cheese. *J Anim Vet Advances*, 5, 1050-1052.
23. Kira CS., Maihara VA., 2007. Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial and neutron activation analysis. *Food Chem*, 100, 390-395.
24. Mendil D., 2006. Mineral and trace metal levels in some cheese collected from Turkey. *Food Chem*, 96, 532-537.
25. Musaiger AO., Al-Saad JA., Al-Hooti DS., Khunji ZA., 1998. Chemical composition of fermented dairy products consumed in Bahrain. *Food Chem*, 61, 49-52.
26. Sanchez-Segarra PJ., Garcia-Martinez M., Gordillo-Otero MJ., Diaz-Valverde A., Amaro-lopez MA., Moreno-Rojas R., 2000. Influence of the addition of fruit on the mineral content of yoghurt: nutritional assessment. *Food Chem*, 70, 85-89.
27. Szefer P., Nriagu JO., 2007. *Mineral Components in Food*. CRC Press, London.
28. Berdanier CD., Dwver J., Feldman EB., 2008. *Handbook of Nutrition and Food*, Second Edition. CRC Pres, London.
29. De la Fuente MA., Montes F., Guerrero G., Juarez M., 2003. Total and soluble content of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chem*, 80, 573-578.
30. Özdemir C., Çelik Ş., Özdemir S., Bakırcı L., Dönmez B., 2000. Erzurum ve yöresinde üretilen inek sütlerinin mineral madde düzeyi ve ağır metal varlığı üzerinde bir araştırma. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tekirdağ.
31. Özrenk E., 2002. Van ili ve ilçelerinde üretilen inek sütlerinin ağır metal kirlilik düzeyi ve bazı mineral madde içerikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Türkiye.
32. Şenol AS., 2004. Sakarya bölgesinde kırsal ve kentsel bölgelerden toplanan sütlerde ağır metal düzeylerinin belirlenmesi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.
33. Vural N., 1996. *Toksikoloji, Metalik Zehirler*. A.Ü. Eczacılık Fak Yay 3, Ankara.
34. Jaradat QM., Momani KA., 1998. Contamination of roadside soil, plants and air with heavy metals in Jordan, a comparative study. *Turk J Chem* 23, 209-220.
35. Algan G., Tekinşen OC., Gök V., 2003. Konya yöresi inek sütlerinde bazı ağır metal içeriklerinin saptanması. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 22-23 Mayıs, 359-362, İzmir.
36. Licata P., Trombetta D., Cristani M., Giofre F., Martino D., Calo M., Naccari F., 2004. Levels of toxic and essential metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Env Int*, 30, 1-6.
37. Tajkarimi M., Faghih MA., Poursoltani H., Nejad AS., Motallebi AA., Mahdavi H., 2008. Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran. *Food Control*, 19, 495-498.
38. Anastasio BA., Caggiano R., Macchiato M., Paolo C., Ragosta M., Paino S., Cortesi ML., 2006. Heavy metal concentrations in dairy products from sheep milk collected in two regions of Southern Italy. *Acta Vet Scan*, 47, 69-74.
39. Ayar A., Sert D., Akın N., 2007. Konya'da tüketime sunulan süt ve ürünlerinin ağır metal

- içeriklerinin belirlenmesi. Selçuk Üni Vet Fak Derg 21, 58-64.
40. Vural A., Narin İ., Erkan ME., Soylak M., 2008. Trace metal levels and some chemical parameters in herby cheese collected from South eastern Anatolia-Turkey. Environ Monit Assess, 139, 27-33.
41. Rubio MR, Sigrist ME., Encinas T., Baroni EE., Coronel JE., Boggio JC., Beldomenico HR., 1998. Cadmium and lead levels in cow's milk from a milking region in Santa Fe Argentine. Bul Env Cont Toxicol, 60, 164-167.
42. Kılıçel F., Tarakçı Z., Sancak H., Durmaz H., 2004. Otlulorların mineral madde ve ağır metal içerikleri. YYÜ Zir Fak Tarım Bil Derg, 14, 41-45.
43. Sağun E., Tarakçı Z., Sancak H., Durmaz H., 2005. Salamura otlulor peynirde olgunlaşma süresince mineral madde değişimi. YYÜ Vet Fak Derg, 16, 21-25.
44. Tarakçı Z., Küçüköner E., 2006. Comparison of basic nutrients, mineral and heavy metal content of herby dairy products. Int J Food Sci and Tech, 1-4.
45. Martin-Hernandez C., Amigo L., Martin-Alvarez PJ., Juarez M., 1992. Differentiation of milks and cheeses according to species based on the mineral content. Z Lebensm Unters Forsch, 194, 541-544.
46. Martino FAR., Sanchez MLF., Sanz-Medel A., 2001. The potential of double ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks. Analytica Chim Acta, 442, 191-200.



Hasak Koyunlarının Akciğer Damarları Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma*

Zekeriya ÖZÜDOĞRU^{1a}, Hatice ÖZDEMİR^{2b}

1. Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Aksaray, TÜRKİYE.
 2. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, TÜRKİYE.
- ORCID: 0000-0002-0789-3628^a, 0000-0001-6360-888X^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
30.09.2019	27.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Özüdoğru Z, Özdemir H: Hasak Koyunlarının Akciğer Damarları Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 15(1): 63-69, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.627027

Öz: Çalışmada, hasak koyunlarında akciğer damarlarının makroanatomik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Deney Hayvanları Ünitesi Birimi'nden temin edilen ortalama 43-62 kg. ağırlığında 8 adet Hasak koyun akciğeri kullanıldı. Materyallere korozyon kast ve latex enjeksiyon metodu uygulandı. Kastları çıkarılan ve diseke edilen akciğerler fotoğraflanarak çalışmada sunuldu. Akciğerler cavum thoracis içinde pleura visceralis (pleura pulmonalis) ile sarılmış olarak bulundu. Temiz kanı kalbe taşıyan venae pulmonales, akciğerin ilgili loplarnı terkettikten kısa bir mesafe sonra v. pulmonalis lobi cranialis dextri ve v. pulmonalis lobi medii'nin birleşmesiyle cranial kökü, v. pulmonalis lobi caudalis dextri, ramus lobi accessorii, v. pulmonalis lobi cranialis sinistri ve v. pulmonalis lobi caudalis sinistri'nin birleşmesiyle caudal kökün oluştuğu ve bu iki kökün atrium sinistere açıldığı tespit edildi. Truncus pulmonalis'in (arteria pulmonalis) sağ ventriküldeki venöz kanı akciğerlere taşıyan bir damar olduğu ve orijininde 3 adet semilunar kapak bulunduğu gözlemlendi. Damar orijininden hemen sonra sinüs trunci pulmonalis denilen bir şişkinlik yaptı ve bifurcatio trachea düzeyinde a. pulmonalis dextra ve a. pulmonalis sinistra'ya ayrılarak sonlandı. Yapılan çalışmada hasak koyunlarının akciğer damarlarının anatomik özellikleri ve diğer türler ile benzerlik ve farklılıkları ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, Anatomi, Damar, Hasak Koyunu.

A Macroanatomic Study on Lung Vessels in Hasak Sheep

Abstract: The aim of this study was to investigate the macroanatomical examination of lung vessels in Hasak sheep. In this study, 8 Hasak sheep lungs from Konya Bahri Dağdaş International Agricultural Research Institute, Unit of Experimental Animals Unit were used. Corrosion casting technique and latex injection were applied to the materials. Corrosion casting technique and latex injection materials were photographed and presented in the study. The lungs were found to be wrapped with pleura visceralis (pleura pulmonalis) in the cavum thoracis. The venae pulmonales, carrying the clean blood to the heart, left the lobes of the lung. Later, cranial root was formed by the merger of the v. pulmonalis lobi cranialis dextri ve v. pulmonalis lobi medii and also caudal root was formed by the merger of the v. pulmonalis lobi caudalis dextri, ramus lobi accessorii, v. pulmonalis lobi cranialis sinistri and v. pulmonalis lobi caudalis sinistri. These two roots were opened to the atrium sinister. It was observed that truncus pulmonalis (arteria pulmonalis) was a vessel that carries the venous blood in the right ventricle to the lungs and 3 semilunar valvula found in its origin. Truncus pulmonalis ended with divided of a. pulmonalis dextra ve a. pulmonalis sinistra at the level of bifurcatio trachea. In this study, anatomical features of lung vessels and similarities and differences with other species were revealed.

Keywords: Anatomy, Hasak sheep, Lung, Vessel.

✉ Zekeriya Özüdoğru

Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 68100, Aksaray, TÜRKİYE.
e-posta: zekeriyaodzudogru@aksaray.edu.tr

*Bu çalışma "Hasak Koyunlarında Broncho-Pulmonar Segmentasyon ve Akciğer Damarları Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma" isimli yüksek lisans tezinin bir bölümünden alınmıştır.

GİRİŞ

Dünyada hayvansal üretim faaliyetleri arasında koyun yetiştiriciliği önemli bir yer tutar. Kullanılmayan mera ve otlaklar koyun yetiştiriciliğinde değerlendirilebilmektedir. Koyunlar, fakir meraları diğer çiftlik hayvanı türlerine göre daha iyi değerlendirdiğinden, insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli et, süt, yapağı ve deri gibi ürünler için üretilirler (1,2).

Resmi Gazete'nin 12 Kasım 2014 yıl ve 29173 sayısında yayınlanarak yürürlüğe giren Yerli Hayvan Irk ve Hatlarının Tescili Hakkındaki Tebliğ'in 4 üncü maddesinin ikinci fıkrasındaki değişiklikle Hasak koyunu Türkiye'nin yerli ırkı olarak tescil edilmiştir.

Ülkemizde et üretimini artırmak için bazı etçi koyun ırklarıyla yerli ırkların melezlemeleri yapılmaktadır. Bu amaçla daha kısa sürede az yem ile daha fazla ağırlığa ulaşabilme kabiliyetine sahip olan Hasak koyun ırkı geliştirilmiştir.

HASAK koyunu, 1989 yılında başlatılan melezleme çalışmaları sonucunda oluşturulmuş, %31.25 Hampshire Down (HD), %31.25 Alman Siyah Başlı Et Koyunu (ASB) ve %37.5 Akkaraman genotipi taşıır (3).

Akciğerlerin iki ayrı dolaşım sistemi vardır; pulmoner arterler, venalar (akciğerlerin fonksiyonel damarları) ve bronşial arterler ve venalar (akciğerlerin beslenme damarları). Bronşial ve pulmoner dolaşım arasındaki intra ve ekstrapulmoner ilişkiler morfolojik ve hemodinamik olarak ilgi konusudur (4,5).

Bronşial arter sirkülasyonu, havanın ısınması ve nemlenmesi gibi bazı fizyolojik fonksiyonlara katılır (6,7). Ayrıca, pulmoner arter tıkanmasından (8) sonra siyanotik konjenital kalp hastalığında ve bazı akciğer enfeksiyonlarında (9) önemli bir koruyucu rolü vardır.

Bronşial arter sistem anatomisinin, kronik astım, bronşektazi, apse ve ampiyem gibi solunum sistemindeki çeşitli patolojik durumlarda önemli olduğu iyi bilinmektedir (10). Ayrıca, akciğer nakli işlemlerinde bronşial dolaşımın bronşial anastomoz iyileşmesinde rol oynadığı görülmektedir. Bronşial

anastomoz komplikasyonları bu tür işlemlerde ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (11).

Bronşial dolaşımdaki deneysel çalışmaların çoğu hayvanlar üzerinde yapılır. Son zamanlarda, koyunlar bu tür çalışmalar için deneysel model olarak kullanılmıştır, çünkü koyunların tek bir bronşial artere sahip olduğu düşünülmektedir, bu da toplam bronş kan akışını ölçmeyi basitleştirmiştir (12,13).

Koyun akciğerlerinin anatomisi hakkında birçok çalışma olmasına rağmen Hasak koyunlarının akciğerleri üzerine herhangi bir anatomik çalışma bulunmadığından böyle bir çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Deney Hayvanları Ünitesi Birimi'nden temin edilen ortalama 43-62 kg. ağırlığında 8 adet Hasak koyun akciğeri kullanıldı. Materyallere korozyon kast (14) ve latex enjeksiyon (15) metotları uygulandı. Bu amaçla, aorta abdominalis serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra içerisine kırmızı kumaş boyası ile renklendirilmiş latex enjekte edildi. Daha sonra akciğerler %10'luk formaldehit solüsyonunda 2 gün bekletildi ve diseke edildi. Damarların kast modelini oluşturmak için %80 oranında sıvı (polymethylmetachrylate) ve %20 oranında toz (monomethylmetachrylate) şekline hazırlanan solüsyon, renkli (mavi ve kırmızı) tahta kalem boyası ile renklendirildikten sonra v. cava cranialis ve aorta abdominalis'ten enjekte edildi. Materyaller 24 saat suda bekletildikten sonra yaklaşık 1 gün süre ile %20'lik potasyum hidroksit solüsyonu içerisinde 37°C'de etüvde bekletilerek kastları elde edildi.

Kastları çıkarılan ve diseke edilen akciğerler fotoğraflanarak çalışmada sunuldu. Ölçümler Mitutoya marka dijital kumpas yardımıyla yapıldı. Araştırmada kullanılan terimlerde Nomina Anatomica Veterinaria (16) (N.A.V.) esas alındı. Araştırmanın AÜVFBEK'nun 15.11.2017 tarih ve

2017/18 sayılı toplantısında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkesine UYGUN olduğuna karar verilmiştir.

BULGULAR

Akciğerlerin cavum thoracis içinde pleura visceralis (pleura pulmonalis) ile sarılmış olarak pulmo dexter ve pulmo sinister olmak üzere iki adet bulunduğu ve bronchus principalis dexter ve sinister vasıtasıyla trachea'ya, arteriae ve venae pulmonales ile kalbe bağlandıkları belirlendi.

Temiz kanı akciğerlere taşıyan venae pulmonales, akciğerin ilgili loplarını terkettikten kısa bir mesafe sonra v. pulmonalis lobi cranialis dextri ve v. pulmonalis lobi medii'nin birleşmesiyle cranial kökü (Şekil 1,2/C), v. pulmonalis lobi caudalis dextri, ramus lobi accessori, v. pulmonalis lobi cranialis sinistri ve v. pulmonalis lobi caudalis sinistri'nin birleşmesiyle caudal kökün (Şekil 1,2/B) oluştuğu ve bu iki kökün atrium sinister'e açıldığı tespit edildi. Caudal kökün çapının 16.75-20.65 mm, cranial kökün çapının ise 14.22-18.90 olduğu belirlendi. Caudal kökün, bifurcatio trachea'nın ventral yüzünde v. pulmonalis lobi caudalis dextri ve ramus lobi accessori'nin oluşturduğu kök ile v. pulmonalis lobi caudalis'in birleşmesi ve tam atrium sinistrum'a açılma yerinde bu birleşmeye v. pulmonalis lobi cranialis sinistri'nin de katılmasıyla oluştuğu tespit edildi.



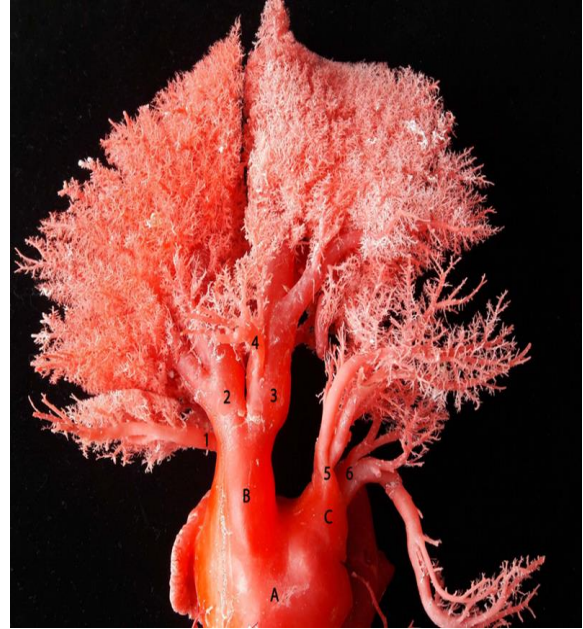
Şekil 1. Akciğer lopları ve venae pulmonales'in ventralden görünüşü (latex).

Figure 1. Ventral view of lung lobes and pulmonary veins (latex).

I: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars cranialis'i, II: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars caudalis'i, III: Lobus caudalis pulmo sinister, IV: Lobus caudalis pulmo dexter, V: Lobus accessorius, VI: Lobus medius VII: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars caudalis'i, VIII: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars cranialis'i.

A: Atrium sinistrum, B: Caudal kök, C: Cranial kök, 1: v. pulmonalis lobi cranialis sinistri, 2: v. pulmonalis lobi caudalis sinistri, 3: v. pulmonalis lobi caudalis dextri, 4: ramus lobi accessori, 5: v. pulmonalis lobi medii, 6: v. pulmonalis lobi cranialis dextri, 7: v. pulmonalis lobi medii'nin lobus cranialis pulmo dexter'in pars caudalis'ine verdiği bir dal.

V. pulmonalis lobi cranialis dextri (Şekil 1,2/6), (çapı 5.62-6.18 mm) lobus cranialis'in pars cranialis'den gelen 4 dalın birleşmesinden oluşan damar ile lobus cranialis'in pars caudalis'inden gelen 2 dalın birleşmesiyle oluşan damarın cranial köke açılmadan 5.52 mm önce birbiriyle birleşmesinden oluştu.



Şekil 2. Venae pulmonales'in dağılımı (Kast).

Figure 2. Branches of pulmonary veins (Cast).

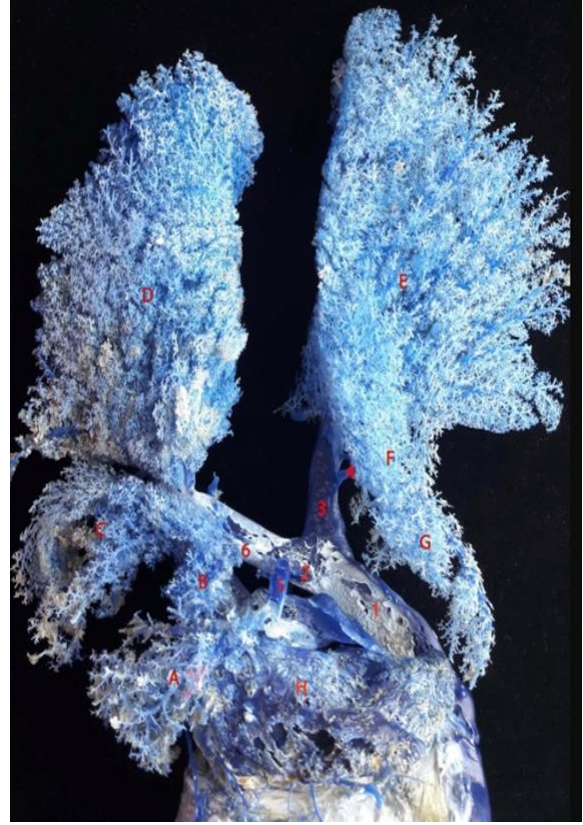
A: Atrium sinistrum, B: Caudal kök, C: Cranial kök, 1: v. pulmonalis lobi cranialis sinistri, 2: v. pulmonalis lobi caudalis sinistri, 3: v. pulmonalis lobi caudalis dextri, 4: ramus lobi accessori, 5: v. pulmonalis lobi medii, 6: v. pulmonalis lobi cranialis dextri.

Lobus accessorius'un ventrali seviyesinden orijin alan ramus lobi accessorii'nin v. pulmonalis lobi caudalis dextri'nin caudal köke katılmadan 11.54 mm önce ventral yüzden bu damara katıldığı tespit edildi. Bu damar 4 adet dalın kendi aralarında birleştikten sonra son bir dalında oluşan bu dala katılmasıyla oluşur.

V. pulmonalis lobi caudalis dextri (Şekil 1,2/3) sağ akciğerin lobus caudalis'inin basisi düzeyinden orijin aldı ve 10.70 mm çapında bir medial dal, 6.23 mm çapında bir lateral dal, 4.39 mm çapında bir dorsal dal ve 2.71-4.10 mm çapında ramus lobi accessorii'yi aldıktan sonra caudal köke açıldı. V. pulmonalis lobi medii'nin (Şekil 1,2/5) çapının 6.34-7.72 mm olduğu ve bu damarın ventral, lateral ve dorsal dalların kendi aralarında birleşmesiyle oluştuğu tespit edildi.

V. pulmonalis lobi caudalis sinistri'nin (Şekil 1,2/2) sol akciğerin lobus caudalis'inden gelen 11.30 mm çapındaki medial dal ile 6.68 mm çapındaki lateral dalın birleşmesiyle oluştuğu tespit edildi. V. pulmonalis lobi cranialis sinistri'nin (Şekil 1,2/1) çapının 7.93-8.51 mm olduğu ve bu damarın sol akciğerin lobus cranialis'inin pars cranialis'inden gelen 2 dalın birleşmesiyle oluşan damar ile sol akciğerin pars caudalis'inden gelen bir damarın birleşmesinden oluştuğu belirlendi. V. pulmonalis lobi caudalis sinistri'nin kalınlığı ile (çapı 13.32-13.90 mm) v. pulmonalis lobi caudalis dextri'nin kalınlığının (çapı 13.40-13.68 mm) birbirine çok yakın olduğu tespit edildi.

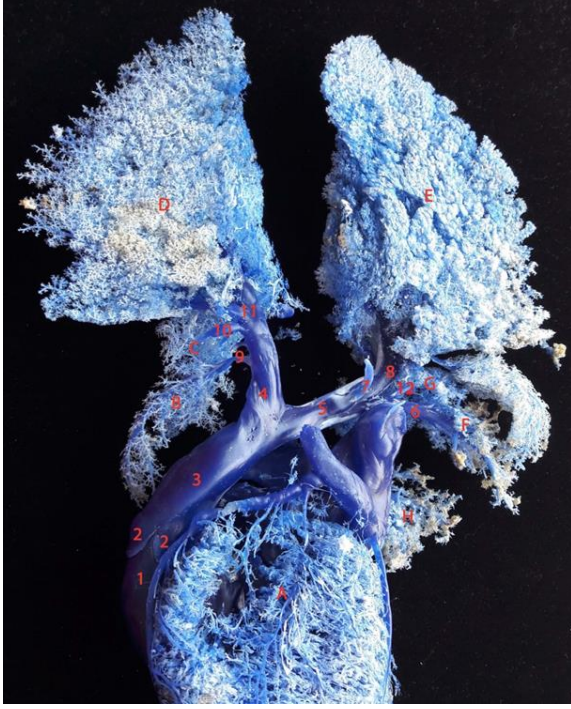
Truncus pulmonalis'in (Arteria pulmonalis) (Şekil 3,4/1) sağ ventriküldeki venöz kanı akciğerlere taşıyan bir damar olduğu ve orijininde 3 adet semilunar kapak (Şekil 4/2) bulunduğu gözlemlendi. Damar orijininden hemen sonra sinus trunci pulmonalis (Şekil 4/3) denilen bir şişkinlik yaptı ve bifurcatio trachea düzeyinde a. pulmonalis dextra ve a. pulmonalis sinistra'ya ayrılarak sonlandı. Truncus pulmonalis'in sağ ventrikülden çıktıktan hemen sonraki çapı 16.29 mm ve orijinden hemen sonra yaptığı sinus trunci pulmonalis'in çapı ise 19.64 mm olarak ölçüldü.



Şekil 3. Truncus (arteria) pulmonalis ve dalları (Kast).
Figure 3. Branches of pulmonal arter (Cast).

A: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars cranialis'i, B: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars caudalis'i, C: Lobus medius, D: Lobus caudalis pulmo dexter, E: Lobus caudalis pulmo sinister, F: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars caudalis'i, G: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars cranialis'i, H: Atrium dexter.
1: Truncus pulmonalis, 2: a. pulmonalis dextra, 3: a. pulmonalis sinistra, 4: r. lobi cranialis sinister'in ramus ascendens'i, 5: r. lobi cranialis dexter'in ramus ascendens'i, 6: r. lobi cranialis dexter'in r. descendens'i.

A. pulmonalis dextra (Şekil 3/2, 4/5) orijininden hemen sonra dorsal yüzünden r. lobi cranialis'in ramus ascendens'ini, 7.39 mm sonra da r. descendens'i verdi. Bu iki damar birbirinden bağımsız olarak çıktı. Daha sonra damarın seyrine devam ederek aynı seviyede laterale doğru r. lobi medii, ventrale doğru r. lobi accessorii ve son olarak r. lobi caudalis'i verdiği tespit edildi.



Şekil 4. Truncus (arteria) pulmonalis'in orijini ve dallanması (Kast).

Figure 4. Origin and branching of pulmoal arter (Cast).

A: Kalp, B: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars cranialis'i, C: Lobus cranialis pulmo sinister'in pars caudalis'i, D: Lobus caudalis pulmo sinister, E: Lobus caudalis pulmo dexter, F: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars caudalis'i, G: Lobus medius, H: Lobus cranialis pulmo dexter'in pars cranialis'i.

1: Truncus pulmonalis, 2: valvula semilunaris, 3: sinus trunci pulmonalis 4: a. pulmonalis sinistra, 5: a. pulmonalis dextra, 6: r. lobi cranialis'in ramus descendens'i, 7: r. lobi accessorii, 8: r. lobi caudalis, 9: r. lobi cranialis'in ramus ascendens'i, 10: r. descendens'i, 11: r. lobi caudalis, 12: r. lobi medii.

A. pulmonalis sinistra (Şekil 3/3, 4/4) orijininden 21.09 mm sonra r. lobi cranialis'in ramus ascendens'ini ve daha sonra da r. descendens'i verdi ve seyrine r. lobi caudalis olarak devam etti.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Akciğerlerin cavum thoracis içinde pleura visceralis (pleura pulmonalis) ile sarılmış olarak pulmo dexter ve pulmo sinister olmak üzere iki adet bulunduğu ve sağ akciğerin lobus cranialis (pars cranialis ve pars caudalis), lobus medius, lobus caudalis, lobus accessorius olmak üzere 5 loptan, sol

akciğerin ise lobus cranialis (pars cranialis ve pars caudalis), lobus caudalis olmak üzere 3 loptan oluştuğu belirlenmiştir.

Bu bulgumuzla ilgili olarak Alsafy (17) bilgisayarlı tomografik çalışma tekniği kullanılarak yetişkin Baladi keçilerinin sol akciğerinde, Nakakuki (18) Japon geyiklerinde ve yine Nakakuki (19) holstein sığırlarının sol akciğerinde aksesuar lobun bulunmadığını bildirmiştir.

Tıprıdamaz ve ark. (20) ruminantlarda venae pulmonales'in, temiz kanı akciğerlere taşıyan ve kapakçıktan yoksun olduğunu ve bu damarların akciğerin ilgili loplarnı terkettikten kısa bir mesafe sonra kendi aralarında birleşerek biri cranial, diğeri caudalde yer alan iki kök halinde atrium sinister'e açıldıklarını tespit etmişlerdir. Cranial kökün v. pulmonalis lobi cranialis dextri ve v. pulmonalis lobi medii; caudal kökün ise v. pulmonalis lobi caudalis dextri, ramus lobi accessorii, v. pulmonalis lobi cranialis sinistri ve v. pulmonalis lobi caudalis sinistri'yi oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sunulan bu çalışmada Hasak koyunlarında venae pulmonales'in dallanması ile ilgili olarak elde edilen bulgular, Tıprıdamaz ve ark.'nın ruminantlarda bildirdiği ile aynıdır.

Nakakuki'nin sığır (19) ve domuz'da (21) bildirdiği gibi pulmoner arterlerin dallarının çoğunlukla bronşiolerin dorsal veya lateral tarafı boyunca uzandığı, pulmoner venlerin ise bronşiolün ventral veya medial tarafı boyunca seyrettiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada, Literatürlerde (22,23,24) bildirildiği gibi truncus pulmonalis'in (Arteria pulmonalis) sağ ventriküldeki venöz kanı akciğerlere taşıyan bir damar olduğu ve orijininde 3 adet semilunar kapak bulunduğu gözlenmiş ve damarın orijininden hemen sonra sinus trunci pulmonalis denilen bir şişkinlik yaptığı ve bifurcatio trachea düzeyinde a. pulmonalis dextra ve a. pulmonalis sinistra'ya ayrılarak sonlandığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bronşial dolaşım sisteminin anatomisinin, kronik astım, bronşektazi, apse ve

ampiyem gibi solunum sistemindeki çeşitli patolojik durumlarda önemli olduğu iyi bilinmektedir.

Koyun akciğerlerinin anatomisi üzerinde birçok çalışma olmasına rağmen Hasak koyunlarının akciğerleri üzerine herhangi bir anatomik çalışma bulunmadığından yapılan bu çalışma ile bu eksiklik giderilmiş olacaktır. Ancak, Türkiye'nin yerli bir koyun ırkı olarak kabul edilen Hasak koyunlarının anatomik özelliklerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Akçapınar H., 1994. Koyun Yetiştiriciliği. 8-14, Medisan Yayınevi, Ankara.
2. Kaymakçı M., 2010. İleri Koyun Yetiştiriciliği. 3. Baskı, 1-51, Meta Basım Matbaacılık, İzmir.
3. Tekin ME., Gürkan M., Karabulut O., Düzgün H., 2005. Performance testing studies and the selection of Hasmer, Hasak, Hasiv and Linmer Crossbreed sheep types. III. Fattening performance. Turk J Vet Anim Sci, 29, 67-73.
4. Kandathil A., Chamarthy M., 2018. Pulmonary vascular anatomy & anatomical variants. Cardiovasc Diagn Ther, 8, 201-207.
5. Ashwini S., Pawar A., Sathisha KB., Girish MH., 2018. Light and electron microscopic study of lungs in Bidri Goat and Deccani Sheep. The Indian J Vet Sci Biotech, 13, 1-5.
6. Baile EM., Dahlby BW., Wiggs BR., Pare PD., 1985. Role of tracheal and bronchial circulation in respiratory heat change. J Appl Physiol, 58, 217-222.
7. De Matteo R., Ishak N., Hanita T., Harding R., 2016. Respiratory adaptation and surfactant composition of unanesthetized male and female lambs differ for up to 8 h after preterm birth. Pediatr Res, 79, 13-21.
8. Tadavart SM., Klugman J., Castadena-Zunca WR., Nath PH., Amplatz K., 1982. Systemic to pulmonary collaterals in pathologic states. Radiology, 144, 55-59.
9. Charan NB., Turk GM., Dhand R., 1985. The role of bronchial circulation in lung abscess. Am Rev Respir Dis, 131, 121-124.
10. Charan NB., Baile EM., Pare PD., 1997. Bronchial vascular congestion and angiogenesis. Eur Resp J, 10, 1173-1180.
11. Veith FJ., Kamholz SL., Montefusco CM., 1983. Lung transplantation. Transplantation, 35, 271-278.
12. Charan NB., Turk GM., Ripley R., 1985. Measurement of bronchial arterial blood flow and bronchovascular resistance in sheep. J Appl Physiol, 59, 305-308.
13. Nguyen VB., De Matteo R., Harding R., Stefanidis A., Polglase GR., Black MJ., 2016. Experimentally induced preterm birth in sheep following a clinical course of antenatal betamethasone: effects on growth and long-term survival. Reprod Sci, 24, 1203-1213.
14. Nerantzis C., Antonakis E., Avgoustakis D., 1978. A new corrosion casting technique. Anat Rec, 191, 321-325.
15. Ayca K., Bilge A., 1984. Plastik enjeksiyon ve korozyon metodu ile vasküler sistem anatomisinin araştırılması. Erciyes Üniv Tıp Fak Derg, 614, 545-552.
16. Nomina Anatomica Veterinaria, 2017. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 5th Edition. Hannover, Columbia.
17. Alsafy MAM., 2008. Computed tomography and cross-sectional anatomy of the thorax of goat. Small Ruminant Res, 79, 158-166.
18. Nakakuki S., 1993. The bronchial tree, lobar division and blood vessels of the Japanese deer (Cervus nippon) lung. J Vet Med Sci, 55, 443-447.
19. Nakakuki S., 1994. The bronchial tree and blood vessels of the cow (Holstein) lung. J Vet Med Sci, 56, 675-679.
20. Tıprıdamaz S., Yalçın H., Beşoluk K., Eken E., 1999. Ruminantlarda Toplardamarlar. 36-39, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.

21. Nakakuki S., 1994. Bronchial tree, lobar divisions and blood vessels of the pig lung. *J Vet Med Sci*, 56, 685-689.
22. Dursun N., 2016. *Veteriner anatomi II*. 89-127, Medisan Yayınevi, Ankara.
23. Marshall MM., Vivian BN., Lombardo P., Megan RS., Jonathan GB., Nitsos I., Beth JA., Harding R., De Matteo R., Schneider M., Graeme RP., Black MJ., 2018. Moderate preterm birth affects right ventricular structure and function and pulmonary artery blood flow in adult sheep. *J Physiol*, 596, 5965-5975.
24. Perez W., Mendez V., Vazquez N., Navarrete M., König HE., 2018. Gross anatomy of the heart of the alpaca. *Anat Histol Embryol*, 47, 110-118.



Sarcoptes ovis ile Enfekte Koyunlarda Serum Protein Fraksiyon Profili

Sedat ÇETİN^{1a}✉, Ayşe USTA^{2b}, Pınar EKİCİ^{3c}, Semiha DEDE^{1d}, Veysel YÜKSEK^{4e}

1. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
 2. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
 3. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.
 4. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.
- ORCID: 0000-0002-6102-8571^a, 0000-0002-5522-3469^b, 0000-0003-2719-5250^c, 0000-0001-5744-6327^d, 0000-0001-7432-4989^e

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
01.11.2019	31.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Çetin S, Usta A, Ekici P, Dede S, Yüksek V: *Sarcoptes ovis* ile Enfekte Koyunlarda Serum Protein Fraksiyon Profili. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 15(1): 70-75, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.641411

Öz: Uyuz hastalığı; her yaştaki koyunlara çabuk bulaşan bir ektoparazit infestasyonudur. Bu çalışma, *Sarcoptes Ovis* ile enfekte hayvanların teşhis ve tedavisinde serum protein fraksiyonlarının önemini ortaya konulması amacıyla planlandı. Çalışma grupları olarak, yaşları 1-4 yaş arasında değişen 18 adet sağlıklı kontrol grubu ve 18 adet aşırı kaşıntı ve yün dökülmesi olan doğal *Sarcoptes ovis* uyuz ile enfekte toplam 36 Akkaraman koyun oluşturmuştur. Alınan kan örneklerindeki serum protein fraksiyonları selüloz-asetat elektroforezi yöntemi ile belirlendi. Serum protein konsantrasyonu kontrol gruplarına göre; total protein ve α -2 globulin bakımından istatistiksel olarak fark bulunamadı. Kontrol gruplarına göre α -1, β - globülin ve albumin istatistiksel olarak hasta grubunda artmasına karşın, gama globulinler hasta grubunda azaldı ($P<0.05$). Yüzde (%) gr protein bakımından α -2 globulin kontrole göre değişmezken, α -1, beta globulin, albumin ve A/G oranı hasta grubunda kontrole göre istatistiksel olarak arttı ($P<0.05$). Gama globulinlerde ise kontrole göre hasta grubunda istatistiksel olarak azalma saptandı ($P<0.01$). Koyunlarda uyuz hastalığının takip ve tedavi sürecinde serum protein parametrelerinin takibinin önemli olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Elektroforez, Koyun, Serum Proteinleri, Uyuz.

Serum Protein Fraction Profile in Sheep Infected with *Sarcoptes ovis*

Abstract: Scabies is an ectoparasitic infestation that is rapidly transmitted to sheep of any age. The present study was conducted to identify the significance of serum protein fractions in the diagnosis and treatment of animals infected by *Sarcoptes ovis*. The study group included 1-4 years old 18 Akkaraman sheeps with excessive itching and molting and infected with natural *Sarcoptes ovis* scabies and the control group included 1-4 years old 18 healthy sheeps, a total of 36 sheeps were included in the present study. Serum protein fractions were determined with the cellulose-acetate electrophoresis method in collected blood samples. There were no significant differences between total protein and α -2 globulin serum protein concentrations in the study and control groups. Although α -1, β -globulin and albumin concentrations were statistically higher in the patient group, gamma globulin levels decreased in the patient group ($P<0.05$). While the percentage (%) g protein did not differ based on α -2 globulin when compared to control, α -1, beta globulin, albumin and A/G ratio statistically increased in the patient group when compared to the control ($P<0.05$). There was a significant decrease in gamma globulins in the patient group when compared to the control ($P<0.01$). It was concluded that monitoring the serum protein parameters might be significant in the follow-up and treatment of scabies in sheep.

Keywords: Electrophoresis, Sheep, Serum Proteins, Scabies.

GİRİŞ

Uyuz, derinin önemli paraziter bir hastalığı olup, özellikle hayvanların toplu halde bulunduğu sonbahar sonu, kış ve ilkbahar başında salgınlar halinde görülmekte, deride kaşıntı, kepeklenme, kabuklanma, kuruma, kalınlaşma ve çatlama gibi birtakım değişikliklerle karakterize bu hastalığın koyunlarda et, süt ve yapağı verimini azalttığı ve ilerlemiş olaylarda ölümlere sebep olduğu bildirilmiştir (1,2).

Uyuzun patogenezesinde humoral ve hücrel immun yanıtın önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Bu immun yanıtta, Ig G, Ig M ve özellikle Ig E sınıfı antikorları önemli bir rol oynamaktadır (3,4,5). Uyuzlu hayvanlarda yangının bir belirtisi olarak total lökosit, T-lenfosit, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller ile α , β ve γ globülin düzeylerinde artış olduğu ifade edilmektedir (5,6).

Serum proteinleri çok sayıda fizyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Klinik olarak önemli olan serum proteinlerinin, lipit, hormon, vitamin ve metalloenzimlerin dolaşımında taşınması ve tamamlayıcı komponentler, hücrel olmayan aktivitenin ve immun sistemin düzenlenmesi de dahil pek çok farklı fonksiyonları vardır. Değişik fizyolojik ve patolojik durumlarda, serumdaki protein miktarları değişir. Gamma globülinler hariç bütün kan proteinleri, karaciğerde sentezlenir (7,8,9).

Serum proteinlerinin elektroforetik analizi klinik laboratuvarında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Serum protein fraksiyonları, kantitatif ve kalitatif olarak; yaş, ısı, hamilelik gibi fizyolojik durumlar, beslenme, cinsiyet, çevresel etkenler ve genetik polimorfizm gibi durumlarda değişim gösterir. Genellikle yaşam süresince serum proteinlerinde yavaş bir artış vardır. Bunların dışında bazı hastalık durumlarında da, organizmadaki bozukluklar sonucu değişimler olabilir (10,11,12).

Hayvan yetiştirmede yapağı ve yün veriminde ekonomik kayıpların nedenleri arasında uyuz önemli yer tutmaktadır. Bu çalışma, *Sarcoptes ovis* ile enfekte hayvanların teşhis ve tedavisinde serum

protein fraksiyonlarının önemini araştırmak amacıyla planlandı.

MATERYAL VE METOT

Hayvan Materyali

Çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.03.2019 tarih ve 2019/02 sayılı kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak yapıldı. Bu araştırmanın materyalini yaşları 1-4 yaş arasında değişen 18 adet sağlıklı ve 18 adet aşırı kaşıntı ve yün dökülmesi olan doğal *Sarcoptes ovis* uyuzla enfekte toplam 36 Akkaraman koyun oluşturmuştur. İlk önce koyunların klinik muayeneleri yapılarak kaşıntı ve yün dökülmesi olan doğal *Sarcoptes ovis* ile enfekte 18 koyun seçilmiştir.

Klinik Bulgular

Hayvanların klinik muayeneleri yapıldıktan sonra her koyunun en az üç değişik yerinden kazıntılar petri kutularına alınarak etrafları bantla iyice izole edilerek kapatıldı. Alınan numunelerin üzerine %30'luk KOH solüsyonunda 5 ml eklenerek çözümleri sağlandıktan sonra her bir numuneden birkaç damla çözelti lam üzerine alınarak mikroskopta 10x objektiflik büyütme ile muayene edildi (13).

Örnek Toplama

Her iki grupta olan hayvanların V. Jugularis'lerinden serum tüplerine 10 ml kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 dakika boyunca 3000 rpm 'de santrifüj edilerek serumları çıkartıldı. Serum örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi. Analizler tüm örnekler için aynı zamanda gerçekleştirilmiştir.

Biyokimyasal Analiz

Toplam protein konsantrasyonları, biuret yöntemi kullanılarak analiz edildi. Serum protein fraksiyonları, Helena Lab-Titan III® Serum Protein

Elektroforez cihazı (Kat No. 3023), Helena Lab-Titan III Selüloz asetat kartları ve Electra HR Buffer (Kat No. 5805) tampon çözeltileri (Helena, Bioscience) kullanılarak ayrıldı. Ponceau S boya çözeltisi ile boyandı. Elektroforezden sonra elde edilen bantlar, Platinum 3.0 programında serum protein fraksiyonları için protein konsantrasyonları belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiştir. Duncan'ın testi çoklu karşılaştırmalar için uygulandı. SPSS (ver 22) istatistik yazılımı kullanılarak $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Sarcoptes ovis ile enfekte koyunlarda serum protein konsantrasyonları tablo-1'de, total serum proteinleri içindeki yüzdesel oranlarının değerlendirilmesi ise tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. *Sarcoptes ovis* ile enfekte koyunlarda serum protein konsantrasyonları.

Table 1. Serum protein concentrations in sheep infected with *Sarcoptes ovis*.

Serum proteinleri (g/d)	Kontrol Grup (n=18)	<i>Sarcoptes ovis</i> ile Enfekte Grup (n=18)
Total protein	11.020 ± 1.879	10.916 ± 2.294
Albumin	3.364 ± 0.720	4.064 ± 0.701*
α ₁ -Globulin	0.600 ± 0.220	0.890 ± 0.301*
α ₂ -Globulin	1.352 ± 0.285	1.394 ± 0.414
β-Globulin	1.119 ± 0.414	1.5433 ± 0.514*
γ -Globulin	4.583 ± 1.229	3.024 ± 0.815**

* $P < 0.05$

Serum protein konsantrasyonu kontrol gruplarına göre; gruplar arasında, total protein ve α-2 globulin istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. α-1, β-globulin ve albumin ise istatistiksel olarak hasta grupta artmasına karşın, gama globulin hasta grupta istatistiksel olarak azaldığı saptanmıştır ($P < 0.05$).

Tablo 2. *Sarcoptes ovis* ile enfekte koyunlarda total serum proteinlerinin yüzdesi.

Table 2. Percentage of total serum proteins in sheep infected with *Sarcoptes ovis*.

Serum proteinleri (% g)	Kontrol Grup (n=18)	<i>Sarcoptes ovis</i> ile Enfekte Grup (n=18)
Albumin	30.542 ± 4.952	37.663 ± 4.341**
α ₁ -Globulin	5.506 ± 1.835	8.164 ± 1.950**
α ₂ -Globulin	12.471 ± 2.504	12.710 ± 2.072
β-Globulin	10.306 ± 3.761	13.911 ± 2.843*
γ -Globulin	41.173 ± 5.952	27.552 ± 3.351**
A/G	0.445 ± 0.103	0.611 ± 0.113**

* $P < 0.05$, A/G:Albumin/Globulin

Yüzde (%) gr protein bakımından; α-2 globulin kontrole göre değişmezken, α-1, β- globulin, albumin ve A/G oranı hasta grupta kontrole göre istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır ($P < 0.05$). Gama globulinlerde ise kontrole göre hasta grupta istatistiksel olarak azalma saptandı ($P < 0.05$).



Şekil 1. *Sarcoptes ovis*'e ait mikroskop görüntüsü (400 'lük büyütme).

Figure 1. Microscope image of *Sarcoptes ovis* (magnification 400x).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Serum proteinleri, hastalıkların teşhisi, analizleri, ve patogenizisi için kullanılan önemli biyokimyasal parametrelerden birisidir. Serum protein fraksiyonlarının belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. En çok kullanılan yöntemlerden biriside serum protein elektroforezidir. Selüloz asetat elektroforezi bu yöntemlerden biridir. Bu yöntem insan hekimliğinde kliniklerde 1950'li yıllardan beri kullanılmaktadır (14,15). Yaptığımız ve yapılan çalışmalar selüloz asetat elektroforez yönteminin veteriner hekim

kliniğinde araştırılmaların daha sağlıklı, daha düşük maliyetli ve kısa sürede yapılmasına büyük katkı sağlayacağını göstermektedir (11,12,16). Son yirmi yılda veteriner hekimlik alanında hastalarda tanısıl bir test olarak serum protein elektroforezinin kullanımında bir artış olduğunu görülmüştür.

Sarcoptes ovis bir ektoparazitdir. Bununla birlikte serum proteinleri ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır. Ancak endoparazitlerle ilgili yayınlar mevcuttur. Apaydın ve Dede (11), doğal olarak *Babesia ovis* ile enfekte koyunlarda yaptıkları çalışmada, A/G oranı, α 1-globulinlerde belirgin şekilde anlamlı bir artış ve ayrıca γ -globülinlerde anlamlı bir azalma olduğunu bildirilmiştir. Yine Dede ve ark., (26) yaptıkları çalışmada, doğal olarak *Theileriosis annulata* ile enfekte olmuş sığırlarda, α -1, α -2 ve β -globülinlerin serum konsantrasyonları, önemsiz ölçüde azalmış ancak bu azalma α -1-globulinler için anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak A/G oranı, α -1 globulinler artarken γ -globülinlerde azalmıştır.

Ozan ve ark. (17), Sandhu ve ark. (18) doğal olarak *Theileriosis annulata* ile enfekte olmuş sığır ve buzağılarda serum total protein konsantrasyonlarının önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da yapılan çalışmalara paralel olarak total protein bakımından fark gözlenmemiştir.

Bununla birlikte diğer çalışmalarda ise klinik bulguları bulunan leishmaniasis'li köpeklerde serum protein profilini araştırmışlar. Gama globülin konsantrasyonu anlamlı olarak daha yüksek ve A/G oranı ise kontrolden daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir (19). Bu farklılığın nedeni kullanılan hayvanın türü, parazitlerin farklı olması, parazitlerin farklı doku ve organlara yerleşmesi olabileceği söylenebilir.

Diğer yapılan bir çalışmada ise doğal olarak *Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerden kan alınarak serum proteinlerini araştırmışlar ve serum β -globülin düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir (20). Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak β - globülin seviyesi anlamlı olarak artmıştır.

Lobetti ve ark. (21), *Boophilus microplus* ile taşınan *Babesia* ile enfekte sığırlarda albüminin seviyesinin arttığını, yine Yeruham ve ark. (22) albümin konsantrasyonunun *Babesia bovis* ile enfekte ineklerde kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak *Theileria annulata* ile enfekte buzağılarda immünoglobulin konsantrasyonları önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (23). Sunulan bu çalışmamızda da literatürlere uyumlu olarak albumin konsantrasyonu önemli derecede artarken, γ -globülinlerde hastalığa bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Leishmania infantum ile enfekte kedilerden kan alınarak serum protein elektroforezini araştırmışlar. α -1 globulin konsantrasyonları sağlıklı kedilere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. (24) Sunulan bu çalışmamızda da paralel olarak, α -1 globulin seviyesi anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Serum proteinleri birçok önemli fonksiyonlara sahiptir. Albumin ozmotik basınç olarak aktif serum proteindir ve aynı zamanda birçok maddenin de önemli bir taşıyıcısıdır. Globülinler, antikorlar ve diğer inflamatuvar molekülleri, hemostatik ve fibrinolitik proteinleri ve lipid, vitamin ve hormon taşıyıcılarını içeren heterojen bir protein grubudur (25,26).

Bağırsak paraziti (taeniosis, coccidiosis, ancylostomosis, trichuriasis ve ascarididosis) sebebi ile mide-bağırsak şikayetlerine sahip 66 köpekten kan alınarak elektroforez yöntemi ile serum proteinlerini araştırmışlar. α -1 globulin düzeylerinin diğer köpeklere göre coccidiosis'li grupta bariz bir şekilde azaldığını, ancylostomosis'li grupta α -2 globulin düzeyleri arttığı, ascarididosis'li köpeklerde ise bu seviyelerin bariz bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Total protein düzeylerinin taeniosis'li köpeklerde artarken, diğer gruplara göre coccidiosis'li grupta azaldığı bildirilmiştir (16). Yapılan bu çalışmada ise total protein ve α -2 globulin konsantrasyonunun kontrol grubuna göre değişmediği, α -2 globulin, β -globulin ve albumin istatistiksel olarak hasta grupta artmasına karşın, gama globülin de ise hasta grubunda azaldığı tespit edildi. Söz konusu

parametrelerde yer alan proteinlerin hastalığa bağlı olarak metabolizmayı etkilediği söylenebilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular serum protein profilinin belirlenmesinin, veteriner hekimlik kliniğinde, özellikle hayvan yetiştirmede yapıldığı ve yün veriminde ekonomik kayıpların nedenleri arasında uyuz hastalığının tanısı, takibi ve tedavi bakımından kullanışlı bir biyokimyasal parameter olarak değerlendirilmesinin önerilebileceği, kanısına varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Güler S., Yılmaz K., 1990. Koyun ve keçilerde paraziter deri hastalıkları. Vet Hek Dern Derg, 60, 60-69.
- Özer E., Şaki CE., Sevgili M., 2018. Koyunlarda doğal psoroptotic ve sarcoptic uyuz ivermektin'in etkisi. Turk J Vet Anim Sci, 22, 73-81.
- Nassef NE., Makled KM., Elzayat EA., Sanad MM., 1991. Humoral and cell mediated immune responses in scabietic patients. J Egypt Soc Parasitol, 3, 765-770.
- Morsy TA., Kenawi MZ., Zohdy HA., Abdalla KF., Fakahany AF., 1993. Serum immunoglobulin and complement values in scabietic patients. J Egypt Soc Parasitol, 23, 221-229.
- Lowenstein M., Loupal G., Baumgartner W., Kutzer E., 1996. Histology of the skin and determination of blood and serum parameters during the recovery phase of sarcoptic mange in cattle after avermectin (Ivomec) treatment. Appl Parasitol, 37, 77-86.
- Fisher WF., Crookshank HR., 1982. Effects of Psoroptes ovis (Acarina: Psoroptidae) on certain biochemical constituents of cattle serum. Vet Parasitol, 11, 241-251.
- Güllü A., Dede S., 2016. The serum protein fractions in thymoquinone treated rats. Afr J Tradit Complement Altern Med, 13, 27-31.
- Adkins JN., Varnum SM., Auberry KJ., Moore RJ., Angell NH., Smith RD., Springer DL., Pounds JG., 2002. Toward a human blood serum proteome: Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, 1, 947-955.
- Jacobs JM., Adkins JN., Qian WJ., Liu T., Shen Y., Camp DG., Smith RD., 2005. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. J Proteome Res, 4, 1073-1085.
- Lastuti NDR., Hastutiek P., Suwanti LT., Chrismanto D., 2018. Exploration of sarcoptes scabiei antigenic protein which play roles in scabies pathogenesis in goats and rabbits. Iran J Parasitol, 13, 466-472.
- Apaydın B., Dede S., 2010. Electrophoretic profile of serum protein fractions from sheep naturally infected with babesia ovis. Revue Med Vet, 161, 57-60.
- Yüksek V., Dede S., Ceylan E., 2013. The electrophoretic determination of serum protein fractions in lycopene treated experimental diabetic rats. Cell Biochem Biophys, 67, 3, 1283-1289.
- Kozat S., Değer S., 2003. Koyunlarda doğal psoroptes ovis uyuzunun moxidectin ile sağaltımı. YYÜ Vet Fak Derg, 14, 19-23.
- Wijnen PA., van Dieijen-Visser MP., 1996. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. Eur J Clin Chem Biochem, 34, 535-545.
- Yüksek V., Ekici P., Dede S., Çetin S., Usta A., 2019. Profiles of serum protein fractions pre-treatment and post-treatment in lambs with pica disorder. TJVR, 3, 67-71.
- Kaymaz AA., Bakırel U., Gönül R., Tan H., 1999. Serum protein electrophoresis in dogs with intestinal parasites. Turk J Vet Anim Sci, 23, 457-459.
- Ozan S., Yaralıoğlu S., Yılmaz S., Ozer E., Şaki CE., Sevgili M., 1999. Theileria annulata ile enfekte sığırlarda GSH-Px, G-6-PD, arginaz aktiviteleri ve bazı biyokimyasal parametreler. Tr J Vet Anim

- Sci, 23, 553-557.
18. Sandhu GS., Grewal AS., Singh A., Kondal JK., Singh J., Brar RS., 2018. Haematological and biochemical studies on experimental theileria annulata infection in crossbred calves. Vet Res Comm, 22, 347-354.
 19. Martinez-Subiela S., Tecles F., Eckersall D., Ceron JJ., 2002. Serum concentration of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. Vet Rec, 150, 241-244.
 20. Turnwald GH., Barta O., 1990. Immunologic and plasma protein disorders. in small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 3rd Edn., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 264-282.
 21. Lobetti RG., Mohr AJL., Dippenaar T., Myburgh E., 2000. A preliminary study on the serum response to canine babesiosis. J South Afr Vet Assoc, 71, 38-42.
 22. Yeruham I., Avidar Y., Aroch I., Hadani A., 2003. Intra-uterine infection with babesia bovis in a 2-day-old Calf. J Vet Med B, 50, 60-62.
 23. Singh A., Singh J., Grewal AS., Brar RS., 2001. Studies on some blood parameters of crossbred calves with experimental theileria annulata infections. Vet Res Comm, 25, 289-300.
 24. Vital S., Dalessandri A., Alfonzetti T., Britti D., Boari A., 2006. Evaluation of total proteins and serum protein fractions in cats naturally infected by leishmania infantum a preliminary study. Vet Res Com, 30, 329-332.
 25. Tothova C., Nagy O., Seidel H., Kovac G., 2010. The effect of storage on the protein electrophoretic pattern in bovine serum. Iranian J Vet Sci Tech, 2, 77-84.
 26. Dede S., Altuğ N., Değer Y., Özdal N., Ceylan E., 2014. Serum biochemical profile and protein fractions in cattle with theileriosis. Revue Med Vet, 165, 137-143.



Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı

Fırat KORKMAZ^{1a}, Beste ÇİL^{2b}

1. Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Ankara, TÜRKİYE.
2. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0002-9600-908X^a, 0000-0003-2822-1625^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
02.09.2019	01.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Korkmaz F, Çil B: Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,15(1): 76-83, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.614120

Öz: Spermanın kalite analizleri, infertilitenin tanımlanmasında ve yardımcı üreme teknikleri yönünden günümüz bilim dünyasında değer kazanmaya başlamıştır. Bu analizlerde tercih edilen yöntemlerin en gelişmişlerinden biri olan akış sitometrisi, akış halindeki bir süspansiyon içindeki çeşitli boyut ve yapıdaki hücre, nükleus ve benzeri hücre komponentleri, kromozomal yapılar ve çeşitli partikülleri de kapsayan taneciklerin, lazer ve özelleştirilmiş dedektörler yardımıyla nitelik ve nicelik özelliklerinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Bu amaçla, florokrom moleküllerle boyanmış örnekler için partiküllerin tek sıralı hale getirilmesinin ardından optik sistemden saçılan lazer ışınına maruz kalmakta, geri dönen ışınlar ise toplanarak elektronik sinyallere dönüştürülmektedir. Elektronik sinyaller ise yazılımlar ile değerlendirilmektedir. Akış sitometrisinin, geniş kullanım yelpazesi içerisinde, gelişen infertilite teşhis metodları ve yardımcı üreme teknikleri sayesinde ilk olarak beşeri androloji laboratuvarlarında, hemen ardından ise veteriner androloji laboratuvarlarında, spermatozoanın konsantrasyonu; plazma membran ve akrozom bütünlüğü; apoptosiz; mitokondriyal membran potansiyeli; kapasitasyon; oksidatif stres; lipid peroksidasyonu; DNA bütünlüğü ve cinsiyetin belirlenmesi vb. amaçlar ile kullanılmaya başlanmıştır. Bu derlemede akış sitometrisi ve analizlerinin sperma kalitesini belirlemedeki rolü ve önemi açıklanarak ilgili sperm kalite parametrelerinin ölçümünde kullanılan protokoller hakkında detaylı bilgilendirme sağlanması hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akış Sitometrisi, Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma, Sperma Analizi, Suni Tohumlama, Veteriner Androloji.

The Use of Flow Cytometry in Semen Quality Analyses

Abstract: Quality analysis of semen has started to gain value in the recent scientific world in terms of defining infertility and assisted reproductive techniques. Flow cytometry, the most advanced method of choice in these analyzes, is a method based on measuring the quality and quantity of particles including cells, nucleus, chromosomal structures and various particles with its sizes and structures in a flowing suspension by means of lasers and detectors. For this purpose, the particles that are stained with fluorochrome molecules are exposed to the laser beam scattered from the optical system after being unified, and the returning rays are collected and converted into electronic signals. Electronic signals are evaluated with softwares. Within a wide range of uses, i.e. the concentration of spermatozoa; plasma membrane and acrosome integrity; apoptosiz; mitochondrial membrane potential, capacitation status; oxidative stress; lipid peroxidation; DNA integrity and gender determination purposes etc., it has been used as infertility diagnostic methods and assisted reproductive techniques which have been developed, firstly in human andrology laboratories and then in veterinary andrology laboratories. The aim of this review is to explain the role and importance of flow cytometry and in determining sperm quality and to provide detailed information about the relevant protocols.

Keywords: Artificial Insemination, Flow Cytometry, Semen Analyses, Sexed Semen, Veterinary Andrology.

✉Fırat Korkmaz

Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Ankara, TÜRKİYE.
e-posta: firatkorkmaz@yandex.com

GİRİŞ

Mikroskopun mucidi olan Antoni van Leeuwenhoek'un (1) 1677 yılında '*animalculus*' olarak tanımladığı spermatozoonların keşfiyle birlikte sperma kalite analizlerinin de ilk ve en önemli adımı atılmıştır. Sadece varlığı ve hareket modelleri belirlenen spermatozoonun, yavruyu kendi başına oluşturabileceğine inanılan *organizmacık* ya da bir parazit gibi düşünülen *spermatik kurtçuk* tanımlarından sıyrılması ise dişi gamet hücrenin - oosit- keşfi, fertilizasyonun ve gametogenezin anlaşılması ile 1900'lü yılların başlarında gerçekleşmiştir (2). Böylece sperma kalite analizleri de ilk olarak infertilitenin tanımlanmasında ve ardından yardımcı üreme teknikleri yönünden bilim dünyasında değer kazanmaya başlamıştır. İzleyen yıllarda, ejakülat içerisindeki spermatozoon sayısının belirlenmesi (3), sperm motilite tayini (4-6), sperm anomali ve morfolojisi (7,8), Bilgisayar destekli sperm analizi (CASA) gibi yöntemler birçok androloji laboratuvarının standardına girerek kullanılmaya başlanmıştır (9).

1970'li yılların sonunda ise ilk kez akış sitometrisi ve sperm tanımlarının birlikte anıldığı çalışma van Dilla ve ark. (10) tarafından yayınlanmıştır. Sperma kalite analizlerine yönelik, floresan temelli, birkaç saniye içinde binlerce hücrenin monitarizasyonunu sağlayan bu yöntem 2000'li yıllarla birlikte ivme kazanarak, spermatozoa canlılık, mitokondriyal membran potansiyeli, lipid peroksidasyon, oksidatif stres, DNA analizi gibi birçok

kalite parametre analizinin yanı sıra, cinsiyet seçimini de olanaklı hale getiren bir yöntem olarak geliştirilmiştir.

Akış sitometrisi, akış halindeki bir süspansiyon içindeki çeşitli boyut ve yapıdaki hücre, nükleus, kromozomal yapılar ve çeşitli partikülleri de kapsayan taneciklerin, lazer ve dedektörler yardımıyla nitelik ve nicelik özelliklerinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Üç bileşenden oluşan akış sitometrisinde; ölçülecek partikülleri lazer önüne taşıyan akışkanlar sistemi, ölçüm yapan lazerleri içeren ve partiküllerden dönen sinyalleri toplayan dedektörleri barındıran optik sistem, bu optik sinyalleri elektronik sinyallere çeviren ve değerlendirilebilir hale getiren elektronik sistemler bulunur.

Çalışma prensibi basitçe; florokrom moleküllerle (Tablo 1.) boyanmış örnekler için partiküllerin, hidrodinamik ya da akustik odaklanma ile tek sıralı hale getirilişi, optik sistemden lazer ışın saçılması, partiküllerin ışına maruz bırakılması, dönen ışının toplanması ve toplanan verilerin elektronik sinyallere dönüştürülerek değerlendirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Tüm bu süreç bir saniye içerisinde binlerce partiküle uygulanabilir ve bu partiküllerin sayısı 'events- kayıt' olarak tanımlanmaktadır. Tekli ya da çoğul sonuçlar genellikle bir histogram ya da dot plot aracılığıyla yapılacak seçim işlemi ile ölçüm yapılan popülasyona göre yüzdesel ya da rakamsal olarak elde edilmekte ve değerlendirilmektedir.

Tablo 1. Sperma muayenesinde kullanılan çeşitli florokromlar (11).

Table 1. The various fluorochromes used in semen examination (11).

Membran Bütünlüğü	Membran Stabilitesi	Plazma Membran Ve Akrozom Bütünlüğü	Mitokondriyal Bütünlük	Oksidatif Stres	Lipid Peroksidasyon	Kromatin/DNA Bütünlüğü	Apoptosis
CFDA	Mero-540	SYBR-14/PE-PNA/PI	Rhodamine	DCFDA	BODIPY C11	TUNEL	Annexin V
SYBR-14/PI	Yo-PRO-1	FITC-PNA/PSA-PI	JC-1	MITOSOX		COMET	
Etdh	SNARF-1	Ca iyonoforları	MitoTracker	CellROX Deep Red, Green, Orange		SCSA	
CellROX Deep Green				DHE			

1. BİYOMEDİKAL ALANDA KULLANIMI

Akış sitometrisi tekniği biyomedikal alanda özel laboratuvarlar ve hastanelerde kendisine önemli bir yer edinmiştir. Kanseri tanı ve aşamalandırılması (12), HIV prognozunun tayini (13), çeşitli kan hastalıkları (lenfoma, lösemi gibi) (14,15), intrasellüler komponentlerin değişimi (Kalsiyum, lipid vb.) (16), DNA bütünlüğü (17) ya da ek cihazlar ile sorting (ayırma) sayesinde hücrelerin birbirinden ayrılması (cinsiyet seçimi gibi) (18-19) gibi durumlarda dünyada sıklıkla kullanılmaktadır.

2. VETERİNER ANDROLOJİDE KULLANIMI VE SPERMA KALİTE MUAYENESİ TESTLERİ

Geniş kullanım yelpazesi içerisinde, gelişen infertilite teşhis metodları ve yardımcı üreme teknikleri sayesinde ilk olarak beşeri androloji laboratuvarlarında ardından da veteriner androloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmıştır (20). Bu bağlamda veteriner androloji alanında akış sitometrisinin kullanım alanları;

2.1. Konsantrasyon Ve Spermatozoa Sayımı (Spermatozoa Konsantrasyonu)

Spermatozoa konsantrasyonunun belirlenmesi gerek dondurma prosedürleri gerekse *in vitro* fertilizasyon (IVF) uygulamaları açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılacak ölçümlerde, hemositometre, spektrofotometre ya da CASA yöntemlerine alternatif olarak akış sitometrisi de kullanılabilir bir yöntemdir. Diğer metotlardan farklı olarak, 'beads' denilen taneciklerin örneğe eklenmesi ve saydırılması şeklinde ya da bir kalite analizine (özellikle canlılık (SYBR-14/PI)) ek olarak bu işlem gerçekleştirilebilir. Bu amaçla genellikle, türe bağlı olmakla birlikte boğa sperması için, dilüe edilen ejakülat (1:100- 1:250) ya da dondurulmuş çözdürülmüş 60×10^6 sperma (1:20) SYBR-14 ve Propidium iodide (PI) boyama yöntemleriyle boyanarak belirli bir hacim ayarlanarak analize tabi tutulur ve Forward Scatter (FS)/Side Scatter (SS) alanlarından popülasyonun belirlenmesi ile toplanacak sayım verisi, önceden bilinen hacim için

konsantrasyon verisi olarak değerlendirilir (21,22). Ancak bu yöntemin, hızlı olmasının yanısıra canlılık oranına ek olarak alınması olumlu olarak değerlendirilse de sperma sulandırıcılarında bulunan farklı partiküllerden ve az hacimli örneklerde yapılan pipetleme uygulaması hatalarından etkilenmeyeceği unutulmamalıdır.

2.2. Spermatozoonun Plazma Membranı Ve Akrozom Bütünlüğü (PMAI= Plazma Membranı Ve Akrozomu Sağlam Spermatozoa)

Sözcük anlamı 'yaşayabilirlik' olarak tanımlanan viyabilite içinde de değerlendirilen plazma membranı veya akrozom bütünlüğü fertilité açısından da önemli belirteçlerden bir tanesidir. Spermatozoonun plazma membranı ve akrozom bütünlüğünü birlikte değerlendiren bu analiz de androloji laboratuvarlarının birçoğunun kullanmakta olduğu floresan boyaların akış sitometrisi yöntemine adapte edilmesi sonucu hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu amaçla yaygın olarak, SYBR-14, Propidium iodide (PI), FITC-PNA, FITC-PSA, Yo-Pro-1, 7-AAD, rhodamine 123, carboxyfluorescein diacetate gibi floresan boyalar ya da PI ile kombinasyonları kullanılmaktadır (20). Teknik, genellikle PI ile kombinasyonların membrandan geçebilen (örn. PI) ya da geçemeyen DNA'ya bağlanabilen (örn. SYBR-14) florokromların saptanması üzerine kuruludur. Bu amaçla örnekler SYBR-14 ve PI ile laboratuvarların kendine ait protokolleri kapsamında boyanarak (23) 488 nm lik argon lazer ve 515 nm-545 nm (SYBR), 561 nm-583 nm emisyon filtreleri ile ölçümleri yapılır. Boğa spermasında PMAI'nin belirlenmesinde, çok yaygın olarak kullanılan SYBR-14/PI kombinasyonunun Nagy ve ark. (24) yapmış oldukları çalışma ile tekrarlandığında verdiği doğruluk ve dondurma aşamasında eklenen yumurta sarısından dolayı verdiği hata sebebiyle yerini fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated PNA ve PI kombinasyonuna bırakması önerilmektedir. Böylece, FITC-PNA ile akrozom bütünlüğü değerlendirilirken, PI ile plazma membran bütünlüğü ile ilgili veri debrisden olabildiğince arındırılarak elde edilebilir. Bu amaçla, 5 µl FITC-PNA (100 µg/ml) ve 3 µl PI (2.99

mM), 492 µl dilüe sperma solüsyonuna aktarılarak boyama yapılır (25).

2.3. Apoptozis

Apoptozis, kromatin agregasyonu, sitoplazmik ve nükleer defektleri de içeren programlı hücre ölümünü tanımlayan terimdir. Hücre ölümünün (Apoptozis), infertilite ile arasındaki bağlantıdan dolayı akış sitometrisi ile spermatozoa apoptozisin belirlenmesi hızlı ve güvenilir bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla, hücre lipid membranının iç kısmında bulunan *phosphatidylserine*'lere afinitesi olan Annexin V en sık kullanılan florokrom olarak karşımıza çıkmaktadır. FITC konjuge hali ise, daha hassas olması sebebiyle ticari olarak da bulunmakta olan probun boğa sperması için kullanımı, ticari kitler de değişmekle birlikte, PI ile olmaktadır (26).

2.4. Spermatozoanın Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondriyal membran potansiyeli, spermatozoon mitokondriyasının oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmesi ve kapasitasyon ile ilgili bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Düşük mitokondriyal membran potansiyeli, spermatozoa anomalisine ya da dondurma çözdürme sırasındaki kriyo hasara bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi canlılık testleriyle birlikte önem taşımaktadır. Bu amaçla, 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimi-dazolyl-carbocyanine iodi de (JC-1), rhodamine 123 ve MitoTracker (MITO) sıklıkla kullanılan florokromlardır. JC-1, spermatozoon mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesinde sık kullanılan prob olarak karşımıza çıkmaktadır. Düşük membran potansiyelinde; yeşil, yüksek olduğu durumlarda ise turuncu renkli ışımaya veren bir florokrom olarak çalışmaktadır. Farklı protokoller (25,27) ile yapılan boyama sonucu 488 nm Argon lazer ve 535 nm, 595 nm emisyon filtreleri yardımıyla ölçüm yapılır. Bu amaçla, 10 µl JC-1 (0.153 mM) ve 3 µl PI (2.99 mM),

487 µl dilüe sperm solüsyonuna aktarılarak boyama yapılır (25). Elde edilen veri, düşük ve yüksek membran potansiyeli olarak iki popülasyon halinde değerlendirilir.

2.5. Kapasitasyon

Spermatozoa kapasitasyon seviyesinin ölçümü, spermatozoa da şekillenen kalsiyum (Ca) değişimlerinin florokrom özellik gösteren bir antibiyotik olan chlortetracycline (CTC) ile gerçekleştirilmektedir. CTC'nin hücre membranını hücre içi maddelerden olan Ca geçirgenliğini artırması sonucunda, serbest Ca'un hücre içine girişiyle CTC floresan özellik göstermekte bu da akış sitometrisi ile tespit edilerek, bir fertilizasyon öngörüsü olarak kapasitasyon seviyesi belirlenmektedir (28). Yine hücre içi Ca seviyesinin belirlenebilmesi için Fluo-3, ya da daha yeni bir prob olan Fluo-4 AM kullanılabilir.

2.6. Spermatozoanın Oksidatif Stresinin Belirlenmesi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu karşısında, spermanın kendi antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması ve sonucunda ortaya çıkan DNA bütünlüğünün bozulması, membran lipid yapısının defekti ve fertilitenin düşmesi ile gözlemlenebilen bir durumdur. Spermanın dondurulması ve çözdürülmesi işlemleri oksidatif stres oluşumunda büyük rol oynamaktadır (25). Bu nedenle, sperm oksidatif stres parametrelerinin ölçülmesi, dondurma çözdürme işlemlerine dayanıklılık açısından önem taşımaktadır. Oksidatif stresin akış sitometrisiyle belirlenmesinde, 5-(ve-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresence indiacetate (DCFDA) sıkça kullanılan bir florokromdur. 5-(ve-6)-karboksi-2',7'-diklorodihidro floresan'ın diasetat formu olan bu florokrom, hidroksil, süperoksid anyon, nitrojen dioksit radikalleri karbonat anyon radikalleri ve hidrojen peroksit tarafından yeşil floresans veren DCFH e çevrilir (29). Bu amaçla, 5 µl DCFH-DA (10 mM) ve 3 µl PI (2.99 mM), 492 µl dilüe sperm solüsyonuna

aktarılarak boyama yapılır (16). Bunun dışında yine, DHE, MitoSOX, DAF2-DA, CellROX Deep Red, CellROX Orange (30) oksidatif stres ölçümünde kullanılan florokromlardır. Bu metoda da yine bir canlı/ölü hücre ayrımı yapan florokrom eklenmesi (örn. PI) ölü spermatozoonların analiz dışına alınması ile daha doğru sonuç vermesini sağlayacaktır.

2.7. Spermatozoanın Lipid Peroksidasyonu

Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin bir yapıya sahip plazma membranı içeren spermatozoonlara sahip türlerde oksidatif stres, ROS ile reaksiyona giren bu yağ asitlerinin yapısının bozulmasına ve bu sebeple membran yapılarının bozulup, spermatozoonun işlev kaybına sebep olmaktadır. Lipid Peroksidasyonun (LPO) ortaya konulmasında, yağ asidi analogu C11-BODIPY581/591 oldukça sık kullanılan bir LPO tespit florokromudur (31). Bozulmamış membran yapısında kırmızı, perokside olmuş membranda ise yeşil (520 nm) ışığa veren florokrom yine PI ile birlikte kullanılmaktadır. Bu amaçla 5 µl BODIPY C11 (5mM) ve 3 µl PI (2.99 mM), 492 µl dilüe sperm solüsyonuna aktarılarak boyama yapılır (16).

2.8. Spermatozoonun DNA Bütünlüğü

Fertilizasyonun temeli olan genetik materyallerin birleşimi aşamasında spermatozoon DNA'sının paketleme hataları, DNA metilasyonları, histon katlanmaları; herediter olabildiği gibi, oksidatif strese bağlı olarak, çeşitli toksik etkiler altında ya da sperma kriyoprezervasyonu aşamasında ortaya çıkabilmektedir (25). Bu sebeple, fertilizasyon başarısı ve erken embriyonik yaşamın önemli bir kriteri olan DNA bütünlüğü sperma kalite değerlendirmesinde önem taşımaktadır. DNA bütünlüğü, akış sitometrisi ile terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) ya da sperm chromatin structure assay (SCSA) ile ortaya konulabilir (17,32). TUNEL metodu, spermatozoon fiksasyonu ve ticari kitler ile birlikte 488 nm lazer ile değerlendirilmesine dayanmaktadır. Sperm kromatin yapı analizi (SCSA) ise spermatozoon

nükleer kromatininin ısı denatürasyonuna dayanıklılığı ve acridine orange (AO) florokromunun çift iplikçikli DNA da yeşil, tek iplikçikli DNA da kırmızı ışığa vermesine dayalı bir yöntemdir (33). Sperma örnekleri, konsantrasyonları 2×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde TNE buffer solüsyonu ile dilüe edilir. 200 µl sperma örneği önce 400 µl asit-deterjan solüsyonu (pH: 1.2, 0.08-N HCl, 0.15-M NaCl, Ve 0.1% Triton X-100) ile 30 saniye, ardından da fosfat sitrat tamponuna eklenmiş 1.2-mL (6 mg/L) saflaştırılmış AO (0.2-M Na₂HPO₄, 0.1-M sitrik asit, 0.15-M NaCl, ve 1-mM EDTA, pH 6.0) ile boyanır. Örnekler, 3 dakikalık inkübasyonun ardından akış sitometrisi ile iki kez değerlendirilir (34).

2.9. Spermatozoon Cinsiyetinin Belirlenmesi

Suni tohumlama endüstrisinin yaygınlaşması ile birlikte, istenilen cinsiyette yavru eldesi yetiştiricilerin büyük ilgisini çekmiştir. Bu amaçla akış sitometrisi, percoll ve albumin gradient santrifüjü, yüzdürme, sefadeks kolonu, H-Y antijeni metotları gibi birçok yöntem denenerek geliştirilmiştir (35). Bu yöntemlerin geliştirilmesindeki temel prensip X ve Y kromozomlarına sahip spermatozoonların taşıdığı DNA miktarı (36), hücrenin boyutu (37), yüzey yükü (38) veya yüzey antijenleri (39) bakımından farklı olmasıdır. En etkili ayrımın gerçekleştiği metot ise hala akış sitometrisi yöntemi olarak kabul edilmektedir (40). Ancak konvansiyonel tohumlamaya göre elde edilen düşük gebelik oranları, kullanılabilir sperma oranında düşüş, yüksek maliyet, eğitilmiş personel gereksinimi gibi çeşitli dezavantajları bu yöntemin uygulanabilirliğini sınırlamaktadır.

Sığırlarda X kromozomu taşıyan spermatozoon Y kromozomu taşıyana göre %4 daha fazla DNA içermektedir ve bu farklılık sayesinde flow sitometri metoduyla %90 oranında kesinlikle, işlenen spermatozoonun yaklaşık %50'sinin ayrımı yapılabilmektedir. Kalan %50 ise cihaz tarafından cinsiyeti belirlenemediği için atık olarak ayrılmaktadır (41). Spermatozoonun DNA miktarının belirlenebilmesi için hücre membranından geçebilen

ve DNA'ya bağlanan Hoeschst 33342 floresan boyaları kullanılmakta, boyanın yarattığı ışım miktarı dedektör ile tespit edilmekte ve bilgisayar yardımı ile %4'lük bu ışım farkı analiz edilebilmektedir (40).

Kısaca, öncesinde ortalama 7 saat süresince modifiye edilmiş Tyrode's albumin laktat pirüvat (TALP) solüsyonu ile inkübe edilen spermaya Hoeschst 33342 boyası eklenerek yaklaşık 34°C sıcaklıkta 45 dakika inkübasyonu sağlanır. Ardından ayırma solüsyonu ile sulandırılan spermaya gıda boyası ve final konsantrasyon %2 olacak şekilde yumurta sarısı eklenir. Filtrasyonun ardından Tris bazlı sheath solüsyonu ile ayırım gerçekleştirilir (41-43).

Cinsiyet ayrımı işleminin kalitesi sulandırma ve boyama prosedürlerini UV ışınlarına Akış Basıncına elektrostatik alan ve elektrik yüküne bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca sıcaklık, ozmolarite, pH ve kullanılan solüsyonların sterilitesi de işlemin başarısını etkileyebilmektedir (44,45).

SONUÇ

Saha yönelimleri ve teknolojideki gelişmelere göre yenilenen laboratuvar teknikleri arasında kendisine önemli bir yer edinmiş akış sitometrisi metodu bu derlemeyle birlikte veteriner hekimliği androloji laboratuvarlarında kullanım yönüyle, çalışma prensibi ve temel boyama metodlarının teknik detaylarıyla değerlendirilmiştir. Tüm bunlara ek olarak, anlık zamanlarda yüksek ölçüm hızı, objektif olması ve fertiliteye ilişkin sonuçlar verebilmesi yönünden değerli bu metodun kısa ve uzun vadedeki gelişmeleri yakından takip edeceği ve veteriner androloji alanında öncül metotlardan biri olacağı öngörülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Leeuwenhoek A., 1677. Observaciones de Anthonu Lewenhoeck, de natis e semine genitali animalculis. Phil Trans Roy Soc, 12, 1040-1043.
- Andrade-Rocha FT., 2017. On the origins of the semen analysis: A close relationship with the history of the reproductive medicine. J Hum Reprod Sci, 10, 242.
- Lode A., 1891. Untersuchungen über die Zahlen- und Regenerationsverhältnisse der Spermatozoiden bei Hund und Mensch. Pflug Arch Eur J Phy, 50, 278-292.
- Martin E., Carnett JB., Levi JV., Pennington ME., 1902. The surgical treatment of sterility due to obstruction at the epididymis; together with a study of the morphology of human spermatozoa. Univ Pa Med Bull, 15, 2-15.
- Detlefsen JA., 1914. Genetic studies on a cavy species cross. Carnegie Instit Wash, 205, 1-134.
- Hühner M., 1921. Methods of examining for spermatozoa in the diagnosis and treatment of sterility. Int J Surg, 34, 91-100.
- Zeleny C., Faust EC., 1915. Size dimorphism in the spermatozoa from single testes. J Exp Zool, 18, 187-240.
- Williams WW., Savage A., 1925. Observations on the seminal micropathology of bulls. Cornell Vet, 15, 353-375.
- Amann RP., Waberski D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology, 81, 5-17.
- van Dilla MA., Gledhill BL., Lake S., Dean PN., Gray JW., Kachel V., Göhde W., 1977. Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytometry. Problems and approaches. J Histochem Cytochem, 25, 763-773.
- Rodriguez-Martinez H., 2014. Semen evaluation and handling: emerging techniques and future development. In "Animal Andrology: Theories and Applications" Ed., PJ Chenoweth, 509-549. Reproduction Resources, USA
- Barlogie B., Raber MN., Schumann J., Johnson TS., Drewinko B., Swartzendruber DE., Göhde W., Andreeff M., Freireich EJ., 1983. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res, 43, 3982-

- 3997.
13. Hengel RL., Nicholson JK., 2001. An update on the use of flow cytometry in HIV infection and AIDS. *Clin Lab Med*, 21, 841-856.
 14. Solly F., Angelot-Delettre F., Ticchioni M., Geneviève F., Rambaud H., Baseggio L., Plesa A., Debliquis A., Garnache-Ottou F., Roggy A., Campos L., Aanei C., Rosenthal-Allieri A., Georget M., Lachot S., Jacob M., Robillard N., Wuilleme S., Andre-Kerneis E., Cornet E., Salaun V., Bennami H., Lhoumeau A., Arnoulet C., Jacqmin H., Neyman N., Latger-Cannard V., Massin F., Lainey E., Le Garff-Tavernier M., Costopoulos M., Roussel M., Mayeur-Rousse C., Eischen A., Raggeneau V., Derrieux C., Maurer M., Asnafi V., Trinquand A., Brouzes C. and Lhermitte L. 2019. Standardization of Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematological Malignancies: The FranceFlow Group Experience. *Cytometry*, 95, 1008-1018.
 15. Dong HY., Kung JX., Bhardwaj V., McGill J., 2011. Flow cytometry rapidly identifies all acute promyelocytic leukemias with high specificity independent of underlying cytogenetic abnormalities, *Am J Clin Pathol*, 135, 76-84.
 16. Korkmaz F., Malama E., Siuda M., Leiding C., Bollwein H., 2017. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. *Anim Reprod Sci*, 185, 18-27.
 17. Evenson DP., 2016. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*, 169, 56-75.
 18. Ibrahim SF., van den Engh G., 2007. Flow cytometry and cell sorting. In "Cell Separation". Eds., A., Kumar, IY., Galaev B., Mattiasson 19-39. Springer, Berlin, Heidelberg.
 19. Manzoor A., Patoor RA., Akram T., Shah AA., Nazir T., 2017. Sperm sexing and its utility in commercial cattle production: A review. *Adv Anim Vet Sci*, 5, 293-298.
 20. Petrunkina AM., Harrison RAP., 2011. Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry A*, 79, 338-348.
 21. Christensen P., Stenvang JP., Godfrey WL., 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *J Androl*, 25, 255-264.
 22. Yang H., Daly J., Tiersch TR., 2015. Determination of sperm concentration using flow cytometry with simultaneous analysis of sperm plasma membrane integrity in zebrafish *Danio rerio*. *Cytometry*, 89, 350-356.
 23. de Lourdes Pereira M., Oliveira H., Fonseca HM., e Costa FG., Santos C., 2016. The Role of Cytometry for Male Fertility Assessment in Toxicology. In "Flow Cytometry: Select Topics". Eds. I., Schmid, 13-29, Intech Open.
 24. Nagy S., Jansen J., Topper EK., Gadella BM., 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*, 68, 1828-1835.
 25. Gürler H., Malama E., Heppelmann M., Calisici O., Leiding C., Kastelic JP., Bollwein H., 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86, 562-571.
 26. Chaveiro A., Santos P., Da Silva FM., 2007. Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study. *Reprod Domest Anim*, 42, 17-21.
 27. Gliozzi TM., Turri F., Manes S., Cassinelli C., Pizzi F., 2017. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11, 1975-1982.
 28. Kerns K., Zigo M., Drobnis EZ., Sutovsky M., Sutovsky P., 2018. Zinc ion flux during mammalian

- sperm capacitation. *Nat Commun*, 9, 2061.
29. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies KJ., Dennerly PA., Forman HJ., Grisham MB., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 52, 1-6.
 30. de Castro LS., de Assis PM., Siqueira AF., Hamilton TR., Mendes CM., Losano JD., Assumpção ME., 2016. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longev*, 8213071.
 31. Ball BA., Vo AT., Baumber J., 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*, 62, 508-515.
 32. Sharma R., Masaki J., Agarwal A., 2013. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. In "Spermatogenesis". Eds., DT., Carrell, KI., Aston, 279-295. Humana Press, Totowa, NJ.
 33. Evenson D., 2017. Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol*, 6, 495.
 34. Malama E., Zeron Y., Janett F., Siuda M., Roth Z., Bollwein H., 2017. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87, 79-90.
 35. Gledhill BL., 1988. Gender preselection: Historical, technical, and ethical perspectives. In "Seminars in reproductive endocrinology". 385-395. Thieme Medical Publishers, Inc.
 36. Garner DL., Gledhill BL., Pinkel D., Lake S., Stephenson D., van Dilla MA., Johnson LA., 1983. Quantification of the X-and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod*, 28, 312-321.
 37. Cui KH., Matthews CD., 1993. X larger than Y. *Nature*, 366, 117-118.
 38. Kiddy CA., Hafs HD., 1971. Sex ratio at birth-prospects for control; a symposium (591.16 K5). A Symposium. ASAS, Champaign, IL.
 39. Bradley MP., 1989. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. *J Dairy Sci*, 72, 3372-3380.
 40. Seidel Jr GE., 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68, 443-446.
 41. Seidel Jr GE., Garner DL., 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124, 733-743.
 42. Schenk JL., Suh TK., Cran DG., Seidel Jr GE., 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 1375-1391.
 43. Garner DL., Evans KM., Seidel GE., 2013. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. In "Spermatogenesis". Eds., DT., Carrell, KI., Aston, 279-295. Humana Press, Totowa, NJ.
 44. Suh TK., Schenk JL., 2003. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology*, 59, 516.
 45. Vishwanath RJ., Moreno F., 2018. Review: Semen sexing – current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, 12, 85-96.



Kedi ve Köpeklerde Sezaryen ve Piyometra Operasyonlarında Anestezi Teknikleri

Damla Tuğçe OKUR^{1a}, Bülent POLAT^{1b}✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-2733-2155^a, 0000-0002-1790-6808^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
06.08.2019	16.12.2019	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Okur DT, Polat B: Kedi ve Köpeklerde Sezaryen ve Piyometra Operasyonlarında Anestezi Teknikleri. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,15(1): 84-90, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.601974

Öz: Veteriner doğum ve jinekolojide sıklıkla uygulanan sezaryen ve piyometra operasyonlarında hem hastanın ağrı ve acı hissini ortadan kaldırmak hem de hekim ve yardımcıların güvenliğini sağlamak amacıyla anestezi maddeleri kullanılmaktadır. Sezaryen ve piyometra operasyonlarında yapılan premedikasyon, preoperatif dönemde yapılacak intravenöz kateterizasyon ve oksijenizasyon sırasında annede oluşabilecek stres ve kaygı önler. Bununla birlikte dengeli ve etkili bir premedikasyon, induksiyon için kullanılacak anestezi maddesinin miktarının azalmasına neden olur. İndüksiyon için sedatif-hipnotik (tiyopental, propofol, alfaksalon, etomidat), disosiyatif (Ketamin HCL) ve inhalasyon ajanları (izofluran, sevofluran, desfluran) sıklıkla kullanılmaktadır. Gebe hayvanlarda kullanılacak anestezi ve analjezik maddelerin fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle etkilerini kan-beyin bariyerini geçerek gösterir. Bu durum anestezi maddelerinin, plasental bariyeri de kolayca geçerek fetüs üzerinde olumsuz etkiler görülmesine yol açar. Yavruları etkilemeden sadece anneyi anestezide alabilecek bir protokol yoktur. Bu nedenle hem anneyi hem de yavruyu en az şekilde etkileyen bir anestezi protokolü seçilmelidir. Piyometralı hayvanlarda ise başlıca; böbrek yetmezliği, kardiyak aritmi ve hepatik işlev bozukluğu gözlemlendiğinden, bu sorunlara karşı uygun anestezi protokolü seçilmelidir. Bu derleme sezaryen ve piyometra operasyonlarına alınacak hastalarda kullanılacak güvenli ve etkili anestezi maddeleri ve anestezi protokolleri hakkında bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anestezi, Kedi, Köpek, Piyometra operasyonu, Sezaryen operasyonu.

Anesthesia Techniques in Cesarean and Pyometra Operations in Cats and Bitches

Abstract: Anesthetic substances are used in cesarean and pyometra operations, which are frequently applied in veterinary birth and gynecology, both to eliminate the feeling of the ache and the pain of the patient and to ensure the safety of physicians and their assistants. Premedication, carried out in cesarean and pyometra operations, prevents stress and anxiety that may occur in the mother during the oxygenation and intravenous catheterization that will be applied in preoperative period. However, a balanced and effective medication causes to reduce the amount of anesthetic substance to be used for induction. Sedative-hypnotic (thiopental, propofol, alfaxalone, and etomidate), dissociative (Ketamine HCL) and inhalation agents (isoflurane, sevoflurane, and desflurane) are frequently used for induction. Due to their physicochemical properties, the anesthetic and analgesic substances to be used on pregnant animals show their effects by crossing the blood-brain barrier. This situation causes the anesthetic substances can pass easily the placental barrier and to be seen adverse effects on the fetus. There is no protocol that can only anesthetize the mother without affecting the offspring. Therefore, anesthesia protocol that affects minimally both mother and offspring should be chosen. As in pyometra animals, renal failure, cardiac arrhythmia and hepatic dysfunction are observed, an appropriate anesthesia protocol should be chosen against these problems. This compilation is prepared to give information about safe and effective anesthetic substances and anesthesia protocols that can be used on patients undergoing cesarean and pyometra operations.

Keywords: Anesthesia, Bitch, Cat, Cesarean operation, Pyometra operation.

✉Bülent Polat

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: bpolat@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Yunanca *Anaesthesia*'dan türetilen ve "insancılık" anlamına gelen anestezi terimi, vücudun tamamında veya herhangi bir yerinde sağlanan duyu kaybı olarak tanımlanır. Anestezi, sinir dokusunun aktivitesinin bir ilaç veya ilaç kombinasyonu tarafından lokal, bölgesel veya merkezi sinir sisteminin (MSS) baskılanmasıdır (1). İnsan ve veteriner hekimliğindeki operatif müdahaleler sırasında; canlının ağrı ve acı duymasını engellemek, zindeliğini korumak ve iyileşmenin çabuk olabilmesi yönünden anestezinin önemi büyüktür ve tüm bunların ışığında Anesteziyoloji ve Reanimasyon fikri doğmuştur (2). Anestezik maddeler ameliyat edilecek hastalarda immobilizasyon, kaslarda gevşeme, bilinçsizlik ve ağrı duyusunun ortadan kalkmasını sağlar. Anestezi bu etkileri sayesinde; ameliyat sırasında ağrı ve acı hissinin ortadan kalkması sonucu hastaya müdahale edebilme imkânı vermesi ile bu süreçte hekim ve yardımcıların güvenliğini sağlaması gibi iki önemli amaca hizmet eder (3).

1. SEZARYEN OPERASYONU

Sezaryen operasyonu, gebeliğin herhangi bir döneminde, doğumdan önce ya da doğum sırasında, anneye zarar vermeden yavru veya yavruların uterusdan uzaklaştırılmasıdır (4).

1.1. Sezaryen Operasyonunda Hastanın Anesteziye Hazırlanması

Sezaryen operasyonu için ideal anestezi protokolünü; anne ve fetüsün sağlığını tehlikeye atmadan, operasyon şartlarını yerine getirebilecek düzeyde analjezi, kas gevşemesi, sedasyon ve anestezi oluşturmaktadır (3,5-7). Gebe hayvanlarda kullanılacak anestezik ve analjezik maddeler fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle etkilerini kan-beyin bariyerini geçerek gösterir. Kan-beyin bariyerini geçebilen anestezik maddeler, plasental bariyeri de kolayca geçerek fetüs üzerinde etkili olmaktadır (8,9). Anestezik maddelerin neden olduğu depresyon ve yaşam riski, anne ve yavruya eşit düzeydedir (3).

Fakat bu etkileri minimize etmek için birkaç seçenek bulunmaktadır. Bunlar;

- Lokal anestezi tekniği kullanmak,
- Annede istenilen düzeyde anestezi oluşturmak için gereken dozun 1/4-1/8'i kadar anestezik ilaç kullanmak,
- Propofol gibi kısa sürede indüksiyon ve uyanma sağlayan anestezik maddelerden faydalanmak,
- Uyanma sürecini kolaylaştırmak amacıyla anestezik maddelerin antagonisti olanları tercih etmek,
- Hastanın inhalasyon anestezisine maruz kalma süresini minimuma indirmektir (10).

1.2. Sezaryen Operasyonunda Kullanılan Anestezik Maddelerin Etkileri

1.2.1. Premedikasyon

Premedikasyon hastanın anesteziye kolay bir şekilde girmesini, eksitasyon dönemi olmaksızın anestezinin devam etmesini ve hastanın anesteziden sakin bir şekilde çıkmasını sağlar (11). Preoperatif dönemde yapılacak intravenöz kateterizasyon ve oksijenizasyon sırasında annede oluşabilecek stres ve kaygı önler. Bununla birlikte dengeli ve etkili bir premedikasyon, indüksiyon için kullanılacak anestezik madde miktarının azalmasına neden olur (12). Sezaryen operasyonunda premedikasyon amacıyla antikolinergikler, trankilizanlar, sedatifler ve opioidler kullanılmaktadır (13). Antikolinergiklerden glikopirolat'ın plasentaya geçişi kolay olmadığından sezaryen operasyonunda preanestezik ajan olarak tercih edilmektedir (13).

Sedatif ve trankilizan etki oluşturmak amacıyla kullanılan fenotiyazin, benzodiazepin ve α_2 adrenoreseptör agonistlerinin hızlı bir şekilde plasentayı geçmesi, yavrunun solunum ve kardiyovasküler sistemi üzerinde uzun süreli depresif etki oluşturması nedeniyle bu grupta yer alan ajanların sezaryen operasyonunda kullanımı endike değildir (3,5).

Fenotiyazin türevi olan asepromazin, maternal-fetal depresyona ve termoregülasyon mekanizmasında aksaklıklara neden olmaktadır. Sekiz saatten fazla süren bu olumsuz etkiler, annenin MSS'inde depresif etki oluşturarak, hipotansiyona neden olur. Bu tür anesteziik maddelerin düşük dozda kullanımının bile anne ve yeni doğan üzerinde depresif etki oluşturması nedeniyle sezaryen operasyonlarında tercih edilmemelidir. (3,5,14,15).

Benzodiazepin türevi olan diazepam ve midazolam yeni doğanlarda depresyon, letarji, hipotermi, hipotonus ve apneye neden olur (5). Fetal karaciğerin benzodiazepinleri metabolize edebilecek hepatik enzim sistemine sahip olmaması nedeniyle yeni doğanlarda doza bağlı olarak uzun süreli sedasyon oluşabilir. Bu etki doğumdan sonra benzodiazepinlerin antagonisti olan flumazenil ile tersine çevrilebilir. Midazolamın diazepamdan daha kısa etki süresine sahip olması ve suda çözünebilme özelliği nedeniyle sezaryen operasyonlarında tercih edilebilir (12).

Sedatifler arasında yer alan α_2 adrenoreseptör agonisti anesteziik maddelerin antagonistleri uygulandığı zaman, annede oluşan yan etkiler ortadan kaldırılabilmektedir, yeni doğan üzerinde oluşabilecek yan etkilerin giderilmesi oldukça zordur. Yapılan çalışmalarda ksilazinin yeni doğan yavrular üzerinde en yüksek mortalite oranına sahip preanesteziik madde olduğu belirtilmiştir. Bu grupta yer alan anesteziik maddelerin uterus kontraksiyonlarını artırması nedeniyle gebeliğin erken veya geç dönemlerinde kullanımı abortu indükleyebilir. Ayrıca uterustaki kan sirkülasyonunu ve oksijen kapasitesini azaltmaları, anne ve fetüsün arteriyel oksijen basıncında (PaO_2) ve pH değerlerinde düşüğe neden olabilir. Bu sebeple ksilazinin gebelikte kullanımı kontrendikedir (5,16,17). Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada, medetomidin'in α_2 adrenoreseptör agonisti grubunda yer alan diğer anesteziik maddelere göre zararlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (7).

Plasentayı hızla geçen anesteziik maddelerden bir diğeri olan opioidler annede sedasyon ve analjezi

sağlar. Bu grupta yer alan anesteziik maddeler anne ve yavru üzerinde minimal kardiyak depresyona neden olur (12). Fakat doz aşımına bağlı olarak fetüsün respirasyonunu ve sentral sinir sistemini deprese eder (3,18). Bu nedenle solunumu deprese olan ve sürekli uyku halinde bulunan yeni doğan yavrular anneyi ememez. Yeni doğan yavrularda, opioidlerin bu etkileri 24 saat boyunca devam eder ve vücuttan tamamen atılımı 2-6 gün sürer (3,5,18). Opioidlerin antagonistleri de direkt plasentayı geçer. Operasyon sonrası yeni doğan yavruların dil altına 1-2 damla naloksan gibi antagonist ilaçlardan damlatılarak oluşabilecek yan etkiler ortadan kaldırılabilmektedir (5,18). Bir başka yan etkisi ise annede ve yavru da bradikardi oluşumuna neden olmasıdır. Sezaryen operasyonu uygulanan hastalarda opioid kaynaklı bradikardiyi tersine çevirmek için glikopirolat yerine atropin (0.01-0.02 mg/kg, IV veya 0.02-0.04 mg/kg SC veya IM) tercih edilmelidir. Çünkü küçük moleküler yapıya sahip olan atropin plasental bariyeri kolayca geçer ve fetal bradikardi ile mücadele eder. Büyük moleküler yapıya sahip olan glikopirolat ise plasental bariyeri geçemez (12).

1.2.2. İndüksiyon

Sezaryen operasyonunda sedatif-hipnotik (tiyopental, propofol, alfaksalon, etomidat), dissosiyatif (Ketamin HCL) ve inhalasyon ajanlar (izofluran, sevofluran, desfluran) indüksiyonu sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Sedatif-hipnotik grubunda yer alan anesteziik maddelerin plasental geçişi kolay olmasına rağmen, fetal metabolizasyonu hızlıdır (5,19). Bu nedenle de sedatif-hipnotik ajanların sezaryen operasyonunda kullanımı endikedir (5,20).

Sedatif-hipnotik grubunda yer alan tiyopental'in kardiyovasküler ve solunum fonksiyonları üzerindeki farmakolojik etkileri; kardiyak outputun oluşması, arterial basıncın azalması ve periferik vasküler dirençteki değişikliklerdir. Tiyopental annede apne oluşmasına neden olabilir. Apneye bağlı fetal hipoksi gelişebilir, fakat bu durum preoperatif oksijen desteğiyle ortadan kaldırılabilmektedir. Tiyopental İV

uygulandığında hızlı indüksiyon sağlayabilmektedir. Tiyopentale bağlı gelişen yan etkiler düşük dozda (<4 mg/kg) uygulandığı zaman azaltılabilir (5,19).

Propofolün kardiyovasküler ve solunum sistemi üzerindeki farmakolojik etkileri tiyopental ile aynıdır. Hızlı indüksiyon ve plasental geçiş sağlar (5). Neonatal dolaşımda kısa sürede metabolize olur ve atılır (3).

Etomidat, kısa etkili bir hipnotik ajandır. Kardiyovasküler sistemde yan etki oluşturmadan hızlı indüksiyon sağlar (5). Tiyopentale kıyasla fetal mortalite oranı yüksektir. Premedikasyon yapılmayan hastalara yalnızca etomidate kullanıldığında kusma, ağrı ve istemsiz hareketler ortaya çıkabilir. Oluşabilecek yan etkilerin önüne geçmek için indüksiyon öncesi preanestezik ilaçlar kullanılmalıdır (20).

Alfazolon, daha az kardiyopulmoner depresyona neden olan kısa süreli etki gösteren bir anestezi maddesidir. Ayrıca anestezinin devamı için inhalasyon ajanlar yerine propofol ve alfazolen güvenli bir şekilde kullanılabilir (21).

Anesteziyi indüklemek amacıyla kullanılan bir diğer grup ise dissosiyatiflerdir. Bu grupta yer alan ketamin HCl, kedi (3-5 mg/kg IV) ve köpeklerde (2-4 mg/kg IV) düşük dozlarda kullanılabilir. İnsan sezaryen operasyonlarında ketamin HCl 1 mg/kg dozunda kullanıldığında bebekte minimum depresif etki oluştururken (13) insanlara kıyasla kedi ve köpeklerde daha yüksek dozlarla indüksiyon sağlandığı için, neonatal solunum depresyonu oluşma riski daha fazladır. Yapılan retrospektif çalışmalarda da ketamin ile indüklenen anestezi sonrası, yeni doğanlarda mortalite oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (5,14,15).

Sezaryen operasyonlarında, inhalasyon ajanlar indüksiyonu ve anestezinin devamını sağlamak için sıklıkla tercih edilmektedir. Bu ajanların plasentayı kolay geçebilmeleri nedeniyle annede oluşan anestezi derinliği ile yeni doğan yavrulardaki solunum ve kardiyovasküler depresyon doğru orantılıdır

(3,5,18). Annede oluşan anestezinin derinliğine bağlı olarak; maternal hipotansiyon, uterus kan akışında azalma ve fetal asidoz şekillenebilir (3,5). İzofluran, sevofluran ve desfluran gibi inhalasyon ajanları ile indüksiyonda, anesteziden uyanma ve oluşabilecek yan etkilerin ortadan kalkması oldukça hızlıyken, haloten'de ise bu etkiler daha uzun sürede gerçekleşmektedir (3,5). İnhalasyonda kullanılan anestezi maddelerinin etkilerini güçlendirmek için kullanılan nitrik oksit, uygulanacak olan toplam anestezi madde miktarını azaltır (5).

Sezaryen operasyonunda özellikle epidural anestezi tekniğinde lokal anestezi maddeler kullanılmaktadır. Lokal anestezi maddeler genellikle diğer anestezi maddelerle birlikte veya tek başlarına bölgesel olarak kullanılabilir. Lokal anestezi maddeler ester ve amid grubu olmak üzere ikiye ayrılır. Ester grubunda yer alan prokain, tetrakain, benzokain gibi anestezi maddeler maternal ve fetal psödokolinesteraz tarafından metabolize edilir. Amid grubunda yer alan anestezi maddeler lidokain, mepivakain, bupivakain ise hepatik mikrozomal enzimlerle metabolize edilir. Bu nedenle lokal anestezi maddelerinin fetüste birikimi azdır (5).

Lidokain ve mepivakain gibi lokal anestezi maddeler 3 µg/mL'den fazla kullanıldıklarında neonatal depresyona neden olabilir. Epidural ve paravertebral uygulamalar sonrası yoğun ilaç birikimi görülebilir. Buna bağlı olarak da annede hipotansiyon ve uteroplasental perfüzyon oluşabilir. Lokal anestezi maddelerinin kullanımına bağlı oluşabilecek yan etkileri ortadan kaldırmak için vazopresörler, efedrin ve mefentermin gibi maddeler kullanılabilir (5,18). Fakat epidural anestezi, kafa içi basınç artışı, pıhtılaşma bozuklukları, aplastik anemi, hipovolemi, vertebral deformite veya acil durumlar için kontrendikedir. Bu durumlarda, genel anestezi kullanılması gerekmektedir (22). Tablo 1'de sezaryen operasyonları için ideal ve düşük maliyetli anestezi protokollerine yer verilmiştir.

Tablo 1. Sezaryen operasyonunda kullanılan anestezi protokolleri.**Table 1.** Anesthesia protocols used in cesarean operation.

İdeal Anestezi Protokolü	Düşük Maliyetli Anestezi Protokolü
Premedikasyon	Premedikasyon
Atropin (0.02-0.04 mg/kg)	Atropin (0.02-0.04 mg/kg)
Hidromorfin (0.5 mg/kg) veya	Morfin (0.1–0.2 mg/kg) veya
Oksimorfin (0.05-0.1 mg/kg) veya	Butorfanol (0.2-0.4 mg/kg)
Morfin (0.1–0.2 mg/kg) veya	
Butorfanol (0,2-0,4 mg/kg)	
İndüksiyon	İndüksiyon
Midazolam (0.1-0.2 mg/kg) veya	Midazolam (0.1-0.2 mg/kg)
Fentanil (5-10 µg/kg) veya	
Propofol (2-6 mg/kg)	
Anestezinin Devamı	Anestezinin Devamı
Izofluran (%0.5-2) veya	Izofluran (%0.5-2)
Sevofluran (%0.5-2)	

2. PİYOMETRA

Piyometra, uzun süre progesteronun etkisi altında kalan ve patolojik değişikliklere uğrayan uterusun endometriyum tabakasıyla bakterilerin karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan bir uterus enfeksiyonudur (23,24).

2.1. Piyometra Operasyonunda Hastanın Anesteziye Hazırlanması

Piyometralı hayvanlarda başlıca; böbrek yetmezliği, kardiyak aritmi ve hepatik işlev bozukluğu gözlemlendiğinden, bu sorunlara karşı uygun anestezi protokolü seçilmelidir (23). Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için sıvı girişi ile idrar çıkışı izlenmelidir. Böbrek fonksiyonlarını artırmak için dopamin (0.5-3 µg/kg İV), diüretiklerden furosemid (2-4 mg/kg İV, İM, SC) veya %20'lik dekstroz uygulanabilir. Piyometralı köpeklerde operasyon öncesi ve sonrasında oluşabilecek hipotansiyona dikkat edilmelidir. Piyometralı kedi ve köpekler aritmi ve taşikardi yönünden izlenmelidir. Toplam proteini 4 g/dL'den veya albumini 1.5 g/dL'den düşük olan hayvanlarda, preoperatif kolloid uygulaması yapılabilir. Piyometra gözlenen hastaya uygulanacak anestezi protokolü, taşıdığı risk durumuna göre belirlenmelidir. Sistemik belirtilerin gözlemlendiği piyometralı hayvanlar, anestezi sırasında dikkatli bir şekilde takip edilmelidir (23). Piyometralı kedi ve

köpeklerde genellikle böbrek bozuklukları şekillendiği için halotan, barbitürat ve böbrek yoluyla atılan anesteziik maddelerin kullanımı önerilmemektedir (25).

2.2. Piyometra Operasyonunda Kullanılan Anesteziik Maddelerin Etkileri

2.2.1. Premedikasyon

Üriner sistem hastalıklarında premedikasyon amacıyla antikolinergiklerin kullanımı; kalp hızının ve oksijen tüketiminin artmasına ve kardiyak aritmilere neden olduğu için tercih edilmemektedir. Dehidrasyon, şok ve anemi tablosu gözlenmeyen hastalarda sedatif etki oluşturmak amacıyla asepromazin kullanımı önerilmektedir (11).

Kardiyovasküler depresyonu olan piyometralı hastaların, preanesteziik ajanlar kullanılmadan, direkt olarak genel anesteziye alınması gerekir. Premedikasyon yapılan veya yapılmayan hastalarda analjezi amacıyla butorfanol (0.2-0.4 mg/kg) veya oksimorfon (0.05-0.1 mg/kg) kullanılabilir (11). Entübe edilecek hayvanlarda premedikasyon amacıyla vazodilatasyon ve miyokardiyal depresyon oluşturmayan opioid ajanlardan, oksimorfin (0,05-0.1 mg/kg), hidromorfin (0.1-0.2 mg/kg), fentanilden (0.0025-0.005 mg/kg) birisi ile benzodiazepinlerden, diazepam (0.2-0.5 mg/kg), midazolam (0.2-0.5 mg/kg) birisinin kombinasyonu kullanılabilir (1).

2.2.2. İndüksiyon

Piyometra operasyonları hastanın entübe edilip edilmediği yönünden değerlendirilmelidir. Entübasyonun mümkün olmadığı durumlarda, kardiyovasküler stabiliteyi koruması ve aritmilere neden olmaması nedeniyle indüksiyon amacıyla etomidat kullanılabilir. Azaltılmış dozlarda tiyopental sodyum (7-10 mg/kg) ve propofol'ün (2-6 mg/kg) bu

tarz hastalarda kullanımı önerilmektedir. Aritmili köpeklerde, etomidat olmaması durumunda tiyopental ve lidokain ile indüksiyon sağlanabilir (11, 23). Minimal kardiyak depresyona neden olmaları nedeniyle inhalasyon anestezik ajanlardan izofluran ve sevofluran anestezinin devamı için sıklıkla tercih edilmektedir (11, 23). Piyometra operasyonunda kullanılan ideal ve düşük maliyetli anestezi protokolleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Piyometra operasyonunda kullanılan anestezi protokolleri.

Table 2. Anesthesia protocols used in pyometra operation.

İdeal Anestezi Protokolü	Düşük Maliyetli Anestezi Protokolü
Premedikasyon	Premedikasyon
Butorfanol (0,2-0,4 mg / kg) veya	Atropin (0.02-0.04 mg/kg)
Oksimorfin (0.05-0.1 mg/kg) veya	Morfin (0.1–0.2 mg/kg) veya
Morfin (0.1–0.2 mg/kg)	Butorfanol (0,2-0,4 mg / kg)
İndüksiyon	İndüksiyon
Propofol (2-6 mg/kg) veya	Tiyopental (7-10 mg/kg) veya
Tiyopental (7-10 mg/kg) veya	Propofol (2-6 mg/kg)
Etomidat (0.15-0.3 mg/kg)	
Anestezinin Devamı	Anestezinin Devamı
Izofluran (%0.5-2) veya	Izofluran (%0.5-2)
Sevofluran (%0.5-2)	

SONUÇ

Tıbbi uygulamalar için anestezi gerekli bir süreçtir. Planlanan her operasyon öncesi hasta sahibinden anamnez bilgileri alınmalı, hastanın fiziki ve laboratuvar muayeneleri yapılmalıdır. Bulguların tümü değerlendirilerek anestezi için uygun yöntem ve doğru anestezik madde seçimi yapılmalıdır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Tranquilli WJ., Thurmon JC., Grimm KA., 2007. Lumb and Jones Veterinary Anesthesia And Analgesia. 4th ed., 330-335, Blackwell Publishing, Britain.
2. Koç B., Sarıtaş Z., Şener O., 2004. Veteriner Anesteziyoloji ve Reanimasyon. 1th ed., 69-71, Medipress, Malatya.
3. Topal A., 2005. Veteriner Anestezi. 1th ed., 143-147, Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa.
4. Anadol E., Gültiken N., 2014. Kedi ve köpeklerde güç doğum olgusuna şırıjikal yaklaşım ve anestezi seçenekleri. Dicle Üniv Veteriner Fakültesi Dergisi, 1, 15-40.
5. Tranquilli WJ., Thurmon JC., Grimm KA., 2015. Lumb and Jones Veterinary Anesthesia And Analgesia. 5st ed., 330-335, Blackwell Publishing, Britain.
6. Clarke KW., Trim CM., Hall LW., 2014. Veterinary Anaesthesia. 11th ed., 587-598, Saunders Elsevier, Britain.
7. De Cramer KGM., Joubert KE., Nöthling JO., 2017. Puppy survival and vigor associated with the use of low dose medetomidine premedication, propofol induction and maintenance of anesthesia using sevoflurane gas-inhalation for cesarean section in the bitch. Theriogenology, 96, 10-15.
8. Groppetti D., Di Cesare F., Pecile A., Cagnardi P., Merlanti R., D'Urso ES., Ravasio G., 2019. Maternal and neonatal wellbeing during elective C-section induced with a combination of propofol

- and dexmedetomidine: How effective is the placental barrier in dogs?. *Theriogenology*, 129, 90-98.
9. Conde Ruiz C., Del Carro AP., Rosset E., Guyot E., Maroiller L., Buff S., Portier K., 2016. Alfaxalone for total intravenous anaesthesia in bitches undergoing elective caesarean section and its effects on puppies: A randomized clinical trial. *Vet Anaesth Analg*, 43, 281-290.
 10. Self I., 2019. Anaesthesia for canine caesarean section. *Companion Anim*, 24, 84-90.
 11. Koç B., Sarıtaş Z., Şenel O., 2012. *Veteriner Anesteziyoloji ve Reanimasyon*. 2ed., 69-71, Malatya, Medipress.
 12. Mathews KA., Sinclair M., Andrea MS., Tamara G., 2018. *Analgesia and Anesthesia for the Ill or Injured Dog and Cat*. 1th., 279, USA, Wiley Blackwell.
 13. Kanay B., Altan S., 2015. Gebe hayvanlarda anestezi yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 1, 52-57.
 14. Moon PF., Erb HN., Ludders JW., Gleed RD., Pascoe PJ., 2000. Perioperative risk factors for puppies delivered by cesarean section in the United States and Canada. *J Am Anim Hosp Assoc*, 36, 359-368.
 15. Moon Massat PF., Erb HN., 2002. Perioperative factors associated with puppy vigor after delivery by cesarean section. *J Am Anim Hosp Assoc*, 38, 90-96.
 16. Lemke KA., 2004. Perioperative use of selective alpha-2 agonists and antagonists in small animals. *Can Vet J*, 45, 475.
 17. Sinclair MD., 2003. A review of the physiological effects of α 2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J*, 44, 885.
 18. Clarke K., Trim C., Hall L., 2014. *Veterinary anesthesia*. 11th ed., 19-63, Saunders, Elsevier, Britain.
 19. Traas A., 2008. Surgical management of canine and feline dystocia. *Theriogenology*, 70, 337-342.
 20. Doebeli A., Michel E., Bettschart R., Hartnack S., Reichler IM., 2013. Apgar score after induction of anesthesia for canine cesarean section with alfaxalone versus propofol. *Theriogenology*, 80, 850-854.
 21. Robertson, S., Anaesthetic management for caesarean sections in dogs and cats. In *Practice*, 2016. 38, 327-339.
 22. Hu L., Pan J., Zhang S., Yu J., He K., Shu S., Wang R., 2017. Propofol in combination with remifentanyl for cesarean section: Placental transfer and effect on mothers and newborns at different induction to delivery intervals. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 56, 521-526.
 23. Fossum T.W., 2013. *Small Animal Surgery Textbook-E-Book*. 6th ed., 737-741, Elsevier Health Sciences, Philadelphia.
 24. Alaçam E., 2010. *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*. 7th ed., 391, Medisan Yayınevi, Ankara.
 25. Özyurtlu N., 2012. Köpeklerde piyometra ve tedavi seçeneklerine kısa bir bakış. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012, 34-36.



Veteriner Hekimlikte Papillomaviruslar ve Önemi

Selvi Deniz DÖRTTAŞ^{1a}, Seval BİLGE DAĞALP^{1b}✉

1. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0001-9543-0211^a, 0000-0002-1166-721X^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
26.11.2019	10.03.2020	30.04.2020

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Dörttaş SD, Bilge Dağalp S: Veteriner Hekimlikte Papillomaviruslar ve Önemi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,15(1): 91-99, 2020. DOI: 10.17094/ataunivbd.651002

Öz: Papillomaviridae, insanlar dahil tüm omurgalıları enfekte edebilen, enfeksiyöz ajanlara bağlı olan kanser vakalarının % 27-30'undan sorumlu olduğu bilinen en geniş virus ailesidir. Son yıllarda, evcil ve vahşi hayvanlarda çok çeşitli lezyonlara neden olan papillomaviruslar, günümüzde giderek artan sayılarda tespit edilmektedir. Köpeklerde, kedilerde ve sığırlarda oluşan papillomlar veterinerlik alanında önemli bir problemi temsil etmektedir. Papillomaviruslar son yıllarda, büyük çoğunluğu insanlarda ve özellikle sığır, kedi, köpek ve at gibi diğer memeli hayvanlar olmak üzere kuşlar, kaplumbağalar, balıklar gibi memeli olmayan hayvanlarda ve vahşi hayvanlarda artan sayılarda tespit edilmektedir. Özellikle sığır, köpek, at, kemirgen ve insan papillomavirusları hastalıkların tanı, tedavi ve aşı değerlendirilmesi için moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi üzerine bir model olarak kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Yapılan bu araştırmalarla papillomavirus evrimini, biyolojisini, türler arası etkileşimlerini anlama bakımından önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Ayrıca çok çeşitli lezyonlara neden olan papillomaviruslar hayvan sağlığı üzerinde büyük etkiler yapabilmekte ve özellikle çiftlik hayvanlarında görülen papillomavirus kaynaklı hastalıklar önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu derlemede, hayvan papillomavirusları hakkındaki son gelişmeleri genel kapsamlarıyla bir araya getirmek ve hızla gelişen bu alanla ilgili bir güncelleme yapmak hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: At, Kedi, Köpek, Papillomaviruslar, Sığır.

Papillomaviruses and Their Importance in Veterinary Medicine

Abstract: Papillomaviridae is the largest family of viruses known to be responsible for 27-30% of cancer cases due to infectious agents that can infect all vertebrates, including humans. In recent years, papillomaviruses, which cause a wide variety of lesions in domestic and wild animals, are now increasingly identified and papillomas in dogs, cats and cattle represent an important problem in veterinary medicine. In recent years, papillomaviruses have been detected in increasing numbers in humans and in non-mammals such as birds, turtles, fish, and other wild animals, particularly other mammals such as cattle, cats, dogs and horses. In particular, cattle, dogs, horses, rodents and human papillomaviruses are used as a model on molecular biology and cell biology for the diagnosis, treatment and vaccine evaluation of diseases. With these studies, important developments have been made in terms of understanding the evolution, biology and inter-species interactions of papillomavirus. In addition, papillomaviruses, which cause a wide variety of lesions, can have great effects on animal health, and especially papillomavirus-related diseases in farm animals cause significant economic losses. This study aims to bring together the latest developments in animal papillomaviruses with their general scope and make an update on this rapidly developing field.

Keywords: Bovine, Cat, Dog, Horse, Papillomaviruses.

GİRİŞ

Papillomaviruslar (PV) bilinen en eski ve en geniş virus ailelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Filogenetik çalışmalar, virusun Afrika'dan köken aldığını ve birden fazla evrimsel kuvvetin etkisinde kalmasının yanı sıra, memelilerin çeşitlenmesiyle konaklarıyla birlikte gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur (1). Papillomavirusların oluşturduğu siğil benzeri oluşumların tanınması ilk olarak eski Yunan ve Romalılar zamanına dayanmaktadır. 1900'lerin başında lezyonlardan elde edilen filtratların hastalığı bulaştırdığının gösterilmesiyle, insan siğillerinin viral yapısı tanımlanmıştır. Hayvanlarda ise ilk papillomavirus, 1930'larda yabancı pamuk kuyruklu tavşanlarda kutanöz papillomların bulaşıcı niteliğini ortaya koyan Richard Shope tarafından keşfedilmiştir (2). Son yıllarda ise gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalarla insan PV'larının yanı sıra hayvan PV'larında da bir artış görülen *Papillomaviridae* ailesi ICTV raporlarında da belirtildiği gibi iki alt aileden (*Firstpapillomavirinae* ve *Secondpapillomavirinae*) oluşmaktadır ve toplamda 53 generada sınıflandırılmakta ve 130'dan fazla papillomavirus türü içermektedir (3).

1. PAPILOMAVİRUSLARIN TAKSONOMİSİ

Papillomaviruslar ilk olarak Polyomaviruslar ile beraber Papovaviridae adı altında sınıflandırılmıştır. Ancak ortak bir genetik organizasyon sergilemelerine rağmen, papillomavirus genomlarının sekansı polyomaviruslar ile yüksek bir homoloji göstermemektedir ve papillomaviruslar, 2000 yılında ICTV tarafından Papillomaviridae adında farklı bir aile olarak tanımlanmıştır (2). Papillomaviruslar küçük, zarfsız, sirküler, çift iplikçikli DNA (dsDNA) içeren viruslardır. Bu viruslar 6,953bp-8,607bp arası bir genoma sahiptir ve bu küçük boyutlarına rağmen karmaşık bir biyoloji gösterirler (1,4-6). Papillomavirus genomları temelde erken (E), geç (L) ve uzun kodon bölgesi (LCR) olarak 3 bölgeye ayrılır. Erken genomik segment (E), olgunlaşmanın erken aşamalarında epitel hücrelerinde eksprese edilen

sekiz ORF içerir. E gen bölgesi E1, E2, E4 replikasyon proteinlerini ve E5, E6, E7 onkoproteinlerini kodlar. Son yıllarda keşfedilen E3 ve E8 in de aynı bölgede olduğu düşünülmektedir (1,7-9). L1 proteini, viral ikozahedral kapsidin ana bileşenidir ve otomatik olarak virion birleştirme yeteneğine sahiptir. Viral enfeksiyon mekanizmasında, hücre zarı içerisinde bulunan heparan sülfat reseptörlerine kapsidin bağlanmasını etkileyen merkezi bir role sahiptir. Geç protein olan L1, en belirgin olarak epitel tabakalarında ifade edilir. Bu nedenle L1' in tespiti, prodüktif enfeksiyonun temel kanıtı olarak düşünülür. PV partiküllerinin birleşimi sırasında L2 ise viral DNA'ya bağlanır ve kapsitlenmeye ve ardından virus salınmasına katkıda bulunur. E1, E2, L1, L2 gen bölgeleri tek başlarına progeny virusun salınmasına yol açan replikasyon, düzenleme, dengeleme ve paketleme gibi temel görevleri teorik olarak yerine getirebilir. Üçüncü bir yapısal protein olan fakat fonksiyonu henüz belirsiz olan L3 ise sadece BPV-4'te mevcut olarak tanımlanmıştır (1). PV'lar enfekte olmuş memeli bireylerde etkili bir humoral bağışık yanıtı uyarmamakta ve bu nedenle serolojiye dayalı bir taksonomi geliştirilememektedir. Uygun bir hücre kültürü ve laboratuvar hayvanı gibi konak sistemlerinin eksikliği de bir sınırlama getirmektedir. Bu sınırlamalara rağmen, PV taksonomisi için temel şartların sağlanmasında DNA dizisi karşılaştırmaları, filogenetik ağaçların topolojisi, bu virus ailesinin taksonomik değerlendirmesinde vazgeçilmez bir kriter olmaktadır (4,5). 2010 yılından bu yana PV sınıflandırması filogeni, genom organizasyonu, biyolojisi ve patojenitesi göz önüne alınarak yapılmaktadır. PV karşılaştırmaları yapmak için ölçüt olarak L1 gen bölgesi seçilmiştir ve bu genin nükleotid seviyesindeki benzerliklerin yüzdelere göre taksonomik kategoriler belirlenmektedir (6). L1 geninde %90'dan fazla nükleotid kimliğini paylaşan iki PV genomu aynı PV tipine aittir. Yeni bir PV izolatının filogenetik sınıflandırması yapılırken, L1 bölgesindeki DNA dizisinde mevcut papillomaviruslardan %10'dan

fazla farklılık taşıyorsa yeni bir papillomavirus olarak tanımlanmaktadır. %2-10 arasındaki farklılık alt tip ve %2'den az farklılık gösteriyorsa varyant olarak adlandırılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Taksonomik Düzey Kriterleri (4).

Table 1. Taxonomic Level Criteria (4).

Taksonomik Düzey	L1 Orf Benzerliği
Genera	<%60
Tür	%60-70
Tip	%71-89
Subtip	%90-98
Varyant	>%98

2. HAYVANLARDA PAPILOMAVİRUSLAR

Son yıllarda hayvanlarda papillomavirusların tanımlanmasında büyük bir artış meydana gelmiştir. Farklı evcil ve yabani hayvanlarda tespit edilen papillomaviruslar taksonomide yerini almaktadır. Özellikle bilinen papillomavirusların büyük çoğunluğu insan, sığır, koyun, keçi, kedi, köpek gibi memeli konaklardan izole edilmiştir (10).

2.1. Bovine Papillomaviruslar (BPV)

Bovine papillomaviruslar kendiliğinden gerileyen iyi huylu tümörlerin varlığıyla ya da ilerleme gösteren malign neoplazmlarla karakterizedir. Bugüne kadar 5 genusa (cins) ve bir sınıflandırılmamış genusa ayrılmıştır. *Deltapapillomavirus* genusuna ait Deltapapillomavirus 4 türü BPV-1, -2, -13, ve -14 tiplerini; *Epsilonpapillomavirus* genusu Epsilon-papillomavirus 1 türü altında BPV-5 ve -8 tiplerini; *Dyoxipapillomavirus* genusu Dyoxipapillomavirus 1 türü BPV-7 tipini kapsar. BPV-16, -18, -22 tipleri *Dyokappapapillomavirus* genusunda sınıflandırılmıştır. BPV-19 ve -21 tipleri ise henüz sınıflandırılmamış sığır papilloma tipleridir. *Xipapillomavirus* genusunda ise Xipapillomavirus 1 (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -15 ve -23) ve Xipapillomavirus 2 (BPV-12) olmak üzere iki tür bulunur ve bu genusta yer alan BPV -17 ve -20 tiplerinin henüz tür bazında sınıflandırılması yapılmamıştır (1). Son zamanlarda yapılan bir çalışmayla ise BPV-24 olarak adlandırılan bir tip

bildirilmiş ve *Xipapillomavirus* genusuna ait olduğu önerilmiştir (11). Ülkemizde sığır papillomaları üzerine yapılan çalışmalarda BPV-1'in yaygın olduğu (12-14), bunun yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda ise farklı papilloma vakalarında saptanan BPV türleri arasında dikkate değer bir çeşitlilik olduğu ortaya konmuştur (15). Dağalp ve ark. (16) süt ineklerinin memebaşı papillomatozisinde sınıflandırılmamış yeni tiplerin ve daha önceden tanımlanmış 8 BPV tipin (BPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10) varlığını örneklenen sürülerde göstermişlerdir.

2.1.1. Bulaşma ve Çevresel Faktörler

Bovine papillomavirus kontamine sağımlar ve bakım ekipmanları, enfekte sığırlarla temas ile kontamine diğer maddeleri de içeren fomitler gibi yollarla saçılır. Yapılan çalışmalarda virus, epitel dokuda ve viral enfeksiyon rezervuarları olarak düşünülen kanda saptanmıştır. Bunun yanı sıra lenfositler, süt, idrar, oosit, yumurtalık, uterus, kümülüs hücreleri ve uterus lavajıyla bulaşabileceği gösterilmiştir. Bunların yanı sıra enfeksiyonun sineklerle bulaşabildiği de düşünülmektedir (17). Yakın zamanda vertikal bulaşma da bildirilmiştir. BPV DNA'sı sığır uterusunda, amniotik sıvıda, plasentada ve yavrulardan toplanan kan örneklerinde tespit edilmiştir. BPV-1 -2 ve -13'ün, özellikle eğreltiotları bakımından zengin topraklarda otlayan sığırlarda mesane karsinogenleriyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Eğreltiotunun, puquiloside ve quercetin gibi immüno-supresan, mutajenik ve kanserojen etkilere sahip toksik bileşenler içerdiği bilinmektedir (18). Eğreltiotunun bu özellikleri BPV persistansını kolaylaştırabilir (19).

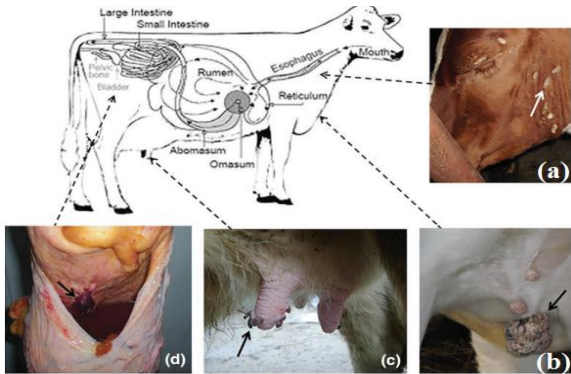
2.1.2. Patogenez ve Patoloji

PV enfeksiyonları, epitelyum hücrelerinin spinöz katmanında hiperplaziye neden olur. Bunun sonucunda dejenerasyon ve hiperkeratinizasyon gibi değişiklikler görülür. Bu değişiklikler genellikle maruziyetten 4-6 hafta sonra başlar ve gerileme göstermeden önce 1-6 ay süreyle devam eder. Papilloma gelişimi birkaç evrede görülmektedir. 1.

evrede papillomlar, dermisin fibroplazisi ve bu fibroma ile bağlantılı olarak epitel çoğalması ile başlayarak biraz yükselmiş plaklar şeklinde görülür. 2. evrede fibropapillomlar virus kaynaklı sitopatoloji, keratinizasyon epitelinde virus replikasyonu ve virion toplanması ile karakterizedir. Bu aşamada, çoğalan epidermis invaziv olarak fibromaya kadar uzanır. 3. evrede ise fibropapillomlar, fibrotik, pedunküleleşmiş yüzeyle ve loblu veya fungiform yüzeylerle karakterize olarak görülür (7).

2.1.3. Klinik Semptomlar

Sığır papillomavirusu, epitelyal proliferatif lezyonlara sebep olan ve yaygın olarak görülen sığır papillomatozisi adı verilen bulaşıcı bir hastalığa sebep olmaktadır. Oluşan lezyonlar, çevresel faktör etkisi ile kombine edildiğinde kendiliğinden gerileyebilir veya malignitelere ilerleyebilir. Etkilenen hayvanlar genellikle geç gelişme, kilo kaybı, sütte ve deri kalitesinde azalma gösterir (20). Laktasyondaki ineklerin meme ve meme uçlarını etkileyen papilloma, buzağı besleme ve elle/mekanik sağımda güçlüğü sebep olurken, sekonder bakteriyel enfeksiyonlar ile mastitise yatkınlığı arttırır. Damızlık sürülerdeki enfeksiyonlarda penisin papillomatozisi, hayvanların kesimini gerektirir (21). Kılılı deri, dil, meme ucu, penis ve vulvada gelişen mukokutanöz papilloma ile ağız boşluğunda, özofagusta ve rumende gelişen üst sindirim sistemi papillomalarına neden olur (Şekil 1).



Şekil 1. Sığırlarda bovine papillomavirusların indüklediği lezyonların farklı lokalizasyonu.

(a) özofageal papilloma (beyaz ok); (b) kutanöz fibropapillomlar (siyah ok); (c) çok sayıda piriç şekilli papillomalar (siyah ok); ve (d) idrar kesesi tümörleri (siyah ok) (17).

Figure 1. Different localization of bovine papillomavirus-induced lesions in cattle. (a) esophageal papilloma (white arrow); (b) cutaneous fibropapillomas (black arrow); (c) a plurality of brass-shaped papillomas (black arrow); and (d) bladder tumors (black arrow) (17).

Mukokutanöz papillomlar genç hayvanlarda daha sık görülmekte ve çoğu sığırdaki hayatı boyunca sigiller gelişmeye devam etmektedir. Sığır mukokutanöz papillomalarında skuamoz papillomlar ve fibropapillomlar bulunur. Skuamoz papillomlar insan papillomaları ile aynı histolojik görünüme sahiptir. Fibropapillomlar ise genellikle BPV-1 ve BPV-2'den kaynaklanır. Hücreler dolgun ve düzenli bir görünümünden yoksunlardır. Sığır mukokutanöz papillomların büyük çoğunluğu kendiliğinden geriler (22). Kutanöz papillomlar ise proliferatif benign tümörlerdir. Bu neoplaziler genelde fiziksel olarak hasar görmüş vaskularize bölgelerde ortaya çıkar. Morfolojik olarak tipik, saplı, atipik, filamentöz ve piriç benzeri şekilde sınıflandırılmaktadır (1). Üst sindirim sistemi papillomalarında ise hastalık oranları, eğreltiotu maruz kalma durumuna bağlanmıştır ve eğreltiotu olan coğrafik bölgelerdeki sığırların % 20'sinde papillom görüldüğü ve bu bitkinin olmadığı bölgelerde sığırların ise sadece %4.4'ünde papillom olduğu bildirilmiştir. Papillomlar kaudal ağız boşluğundan rumene kadar ilerleyebilir. Üst sindirim sistemi papillomaları genellikle klinik hastalığa neden olmaz ve çoğu bir yıl sonra spontan olarak ortadan kalkar (22).

2.1.4. Model Olarak BPV'lerin Önemi

BPV'ler dizilenen ilk papillomavirus genomudur. BPV'lerin patolojisi ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları, HPV'nin de biyolojisi ve patolojisi hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. BPV'nin model olarak kullanımı, birden fazla türe yönelik aşılarda etkinliğini değerlendirmede ve BPV ile ilişkili kanserin moleküler ve hücresel

mekanizmalarını belirlemede, persiste ve inatçı lezyonların iyileştirilmesi için immünoterapötik yaklaşımları test etmekte önem arz etmektedir (23-27).

2.1.5. Türler Arası Enfeksiyonlar

Papillomaviruslar kural olarak tür spesifik kabul edilseler de istisnalar bulunmaktadır; *Deltapapillomavirus* genusuna ait olan BPV-1, -2, -5 ve -13 spesifik bariyerleri aşarak mandaları, atları, tapirleri, zürafaları, eşekleri, bizonları ve zebra ları enfekte edebilmektedir. Bu BPV tipleri sığırların yakın akrabalarında fibropapilloma ve idrar kesesi lezyonlarına sebep olabildiği gibi, hayvanat bahçelerinde veya vahşi doğada yaşayan uzak ilişkili türleri de enfekte ettiğinde sarkoidlere sebep olabilmektedir. BPV-8'in de bir varyantının bizonlarda papillomlara neden olduğu gösterilmiştir (17,20). Etkilenen türler arasında, karnivorların filogenetik olarak uzak bir üyesi olan kediler de bulunmaktadır. BPV-14'ün enfekte ettiği evcil kedilerde de sarkoidlere benzer lezyonlar bildirilmektedir (18,19).

2.2. Equine Papillomaviruslar (EcPV)

Bugüne kadar sekiz equine papillomavirus tespit edilmiş ve genom sekansları yapılmıştır; Bu viruslar *Zetapapillomavirus* genusunda yer alan EcPV1, *Dyoiotapapillomavirus* genusunda yer alan EcPV2, -4, -5 ve *Dyorchopapillomavirusu* genusunda yer alan EcPV3, -6, -7 ve son zamanlarda *Treiskappapapillomavirus* genusu olarak EcPV8 olarak sayılmaktadır. Söz konusu viruslar klinik olarak klasik papillomatozise (EcPV1), genital papillomalara (EcPV2) ve kulak papillomlarına (EcPV3-6) sebep olur. EcPV7 ise penisten alınan bir sürüntüde gözlenmiştir. Son zamanlarda yeni bir papillomavirus olarak bulunan EcPV8 ise plak tipi, jeneralize papillom ile ilişkilendirilmektedir (28,29). EcPV-1'in neden olduğu viral papillomatoz tipik olarak 3 yaşın altındaki atları etkiler. Bulaşma, enfekte bir at ile doğrudan temas yoluyla veya dolaylı olarak fomitler yoluyla gerçekleşebilir. Etkilenen bölgeler çoğunlukla baş, dudaklar, göz kapakları ve bacaklardır. Klasik

papillomatoz tipik olarak 4-9 ay arası kendiliğinden iyileşme göstermektedir. Atların büyük çoğunluğu virusa karşı tamamen bağışıklık geliştirir ve tekrar enfekte olmazlar. Atlardaki genital papillomaların EcPV-2 ve EcPV-7 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar dört papillomavirus (EcPV-3, EcPV-4, EcPV-5 ve EcPV-6), kulak plaklarından alınan örneklerde çoğaltılmış ve filogenetik analizleri *Dyoiotapapillomavirus* (EcPV-4 ve EcPV-5) ve *Dyorchopapillomavirus* (EcPV-3 ve EcPV-6) olarak yapılmıştır. Ayrıca EcPV8'in de genital papillomlar dışında kulak plaklarında da bulunabileceği bildirilmiştir (28,29). Kanat ve ark. (30) genital lezyonlu, klinik olarak sağlıklı ve deri tümörü bulunan atlarda yaptıkları çalışmada, deri tümörü olgularında BPV-1 ve EcPV-2 tespiti yapmışlar; ayrıca hem sağlıklı hem de genital lezyonlu atlardan alınan genital swap örneklerinde EcPV-2, BPV-1 ve BPV-2 tiplerini tespit etmişlerdir.

2.2.1. Equine Sarkoidler

Birden fazla organda granümatöz inflamasyon ile karakterize, dışarı doğru üreyen dermatit olarak veya nodüler bir deri rahatsızlığı olarak görülen sarkoidler atları, katırları ve eşekleri etkileyen benign fibroblastik tümörlerdir. Papillomaviridae ailesinin BPV-1 ve -2 tipleri sarkoidlerin patogeneğinde önemli faktörler olarak bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda, at sarkoidlerindeki BPV-1 L2 proteinde bir delesyon olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, virusun BPV-1 ile tamamen aynı olmadığını önermektedir. Ayrıca sığırlarda BPV enfeksiyonu gerileyebilecek iyi huylu lezyonlar üretirken, sarkoidler virus üretimine izin vermeyen non-permisif ve geri dönüşümsüzdür (31).

2.3. Feline Papillomaviruslar (FcaPV)

Kedileri enfekte eden *Felis catus* Papillomaviruslar (FcaPV), bugüne kadar *Lambdapapillomavirus* genusunda yer alan FcaPV-1, *Dyothepapillomavirus* genusunda yer alan FcaPV-2 ve yapılan çalışmalar sayesinde birbirleriyle ve *Taupapillomavirus* genusuyla yakından ilişkisi saptanan FcaPV-3, -4, -5 türleri olarak

sınıflandırılmıştır (32,33). FcaPV-1 kedilerde oral papilloma neden olur. Papillomlar dilin ventral yüzeyinde küçük ekzofitik kitleler kümesi olarak bulunurlar. Bu lezyonların büyük bir kısmı hastalığın klinik belirtilerine neden olmadan spontan olarak gerilemektedir (34,35). Dyothetapapillomavirus üyesi olan FcaPV-2 ise preneoplastik cilt lezyonlarının, viral plakların ve bowenoid in situ karsinomaların (BİSK'ler) başlıca nedeni olarak düşünülmektedir (32,36). Bunların dışında kedilerden izole edilen FcaPV-3, aynı zamanda FcaPV-2'den daha az sıklıkta olsa da BİSK'lerde tespit edilmiştir. FcaPV-4 ise, ilk defa bir kedinin ağız ve çevresinde tesadüfi bir bulgu olarak bulunmuştur (36). FcaPV-5'in ise atipik viral plaklarla ve BİSK'lerle ilişkisi bildirilmiştir (32).

2.3.1. Feline Sarkoidler

Kedilerde enfeksiyona sebep olan FcaPV türleri dışında, sığırlarda enfeksiyona sebep olan BPV-14 de çapraz enfeksiyon göstererek kedi sarkoidlerine sebep olmaktadır. BPV-14, at sarkoidlerine de neden olan BPV'lerle yakından ilişkili bir Deltapapillomavirusdur ve kedilerde non-produktif bir enfeksiyona neden olabildiği gösterilmiştir. Sığırdan kediye geçiş mekanizması halen bilinmemekle birlikte, lezyonların dağılımı sinekler yoluyla veya kedilerdeki yaralarının BPV-14 ile enfekte edilmesi ile olabileceği düşünülmektedir. Genellikle burun ve üst dudaklar üzerinde gelişirler (34,35).

2.4. Canine Papillomaviruslar (CPV)

Günümüzde yirmi Canine Papillomavirus (CPV) tipi önerilmiştir ve bu tipler *Lambdapapillomavirus* (tip -1 ve -6), *Taupapillomavirus* (tip -2, -7, -13, -17, -19) ve *Chipapillomavirus* (-3, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12, -14, -15, -16, -18 ve -20) generalarına ayrılmıştır (19, 35, 37).

Köpekler CPV'ye bağlı olarak ekzofitik veya endofitik yapıya sahip klasik siğiller, pigmentli plaklar, hiperkeratotik lezyonlar ve bazı durumlarda in situ ya

da invaziv squamoz hücre karsinomları (SCC) olmak üzere çeşitli cilt bozuklukları gösterebilir. Özellikle genç köpekler ağız kavitesinde geniş bir yelpazede görülen köpek papillomatozisinden etkilenirler (37). Canine papillomatozis virusu çevre koşullarına karşı çok dirençlidir ve dezenfektanlar ile elimine edilmesi oldukça zordur. Papillomatozis geçirmiş köpekler doğal bir bağışıklık kazanırlar (38). Köpeklerde pigmentli plaklar, genellikle Chipapillomavirus türleri ile ilişkilidir (39). Plaklar genellikle koyu renklidir ve çoklu olarak bulunurlar. Ekstremitelerin ventrum ve medial yönleri üzerinde yaygın olarak görülür. Pigmente plaklarda viral replikasyon ve PV ile indüklenen hücre değişiklikleri gözlenebilir. Pigmentli plaklar, kendiliğinden gerileyebilir, persiste olabilir veya ilerleme gösterebilir. Genel olarak, pigmentli plakların kozmetik önemi olduğu, sağlık üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı düşünülür. Bununla birlikte, pigmentli plakların nadiren malign transformasyonlara uğrayarak invaziv SCC'ye sebep oldukları bildirilmiştir. Malign transformasyon sadece CPV-9, 12 ve 16 ile ilişkili plaklarda bildirilmiş olsa da, yayınlanmış vakalardan bazılarında, diğer PV türlerinin neden olduğu plaklar için malign potansiyelin bulunduğu bildirilmektedir (40). Canine kutanöz papillomlar CPV-1, 2, 6 ve 7 ile ilişkilendirilmiştir. Genç köpeklerde CPV-1'den kaynaklanan oral papillomlar sık görülür. Köpekler CPV-1 tarafından enfekte olduğunda genellikle bu enfeksiyon gözle görülmeyebilir. Köpek oral papillomlarının büyük çoğunluğu kendiliğinden gerilediği için cerrahi eksizeyona nadiren ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, hücre aracılı bir bağışıklık tepkisinin gelişmesinden kaynaklanmaktadır. Deneysel olarak gelişen papillomlarda, iyileşme tipik olarak 8 hafta içinde oluşur. Bağışıklık yetmezliği olan çok sayıda köpekte CPV-2 kaynaklı papillomaların SCC'lere ilerlediği vakalar görülmüştür (35). Son zamanlarda, iki Basenji köpeğinden gelen ve metastatik SCC'ye ilerleyen viral plaklarda CPV12 ve CPV16 tespit edilmiştir.

3. PAPILOMAVİRUSLARDA TANI

Lezyonlar deride rahatlıkla görülebildiğinden papillomatozisinin tanısı zor değildir. Virusun elektron mikroskopisi ile tanımlanmasında derinin stratum corneum, stratum spinosum ve stratum granulosumundaki hücrelerin çekirdeğinde viral parçacıkların varlığı ortaya konmaktadır. Virusun tespitinde diğer önemli teknik polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Son yıllarda L1, L2, E6 ve E7 proteinlerini kodlayan genom bölgelerine dayalı olarak tasarlanan FAP59/FAP64 ve MY09/MY11 konsensüs primerleriyle yapılan çok sayıda çalışma vardır. Başlangıçta, insan papillomavirusunda L1 kodlayan genom bölgesi temel alınarak tasarlanan konsensüs primerleri insanlar, sığır ve diğer hayvanlardaki papillomavirusları tanımlamak için sıkça kullanılmaktadır (1,3,4,35,37,41).

4. PAPILOMAVİRUSLARDA TEDAVİ, KORUMA ve KONTROL

PV hastalıklarının tedavisinin değerlendirilmesi ve önlenmesi zordur; çünkü hastalık kendi kendini sınırlandırır ve süresi değişkendir. Büyük sürülerde veya lezyon insidansının yüksek olduğu hayvanlarda papillomaların cerrahi eksizyonu yapılabilmektedir. Etkilenen bir hayvanda tümör kitlesinin tamamen çıkarılması, genel fibropapillom regresyonunu uyandırabilir ve diğer türlerdeki papillomlar için de aynı durum geçerlidir. Etkilenen hayvanları tedavi etmek için interferon-alfa ve fotodinamik terapi kullanılmıştır. Ancak yaygın olarak kullanımı yoktur. Bunun dışında lazer tedavisi, kriyoterapi, sistemik retinoidler, azitromisin tedavileri, otolog veya rekombinant papillomavirus aşılı ve homeopatik tarantula zehiri tedavisi anekdot olarak bildirilmiştir. Ayrıca ektoparazitlerin biyolojik olarak kontrolünün yapılmasının BPV insidansını azalttığı gösterilmiştir. Sınırlı bir etkinliğe sahip olan otojen aşılama gibi aşılama modelleriyle ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Fakat birkaç aşı modelinin önerisine rağmen bugüne kadar BPV'ye ve diğer papillomaviruslara karşı ticari bir aşı formülasyonu geliştirilmemiştir. Dahası, bu aşı modellerinin

mutajenik potansiyeli ve stabilitesi hakkında bilgi eksikliği vardır (1,7,20,26,28). Siğil ekstraktlarının profilaktik bir aşı olarak kullanılmasının, köpeklerde oral papillomatozun önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (37).

SONUÇ

Papillomaviridae, insanlar dâhil tüm omurgalıları enfekte edebilen, enfeksiyöz ajanlara bağlı olan kanser vakalarının % 27-30'undan sorumlu olduğu bilinen en geniş virus ailesidir. Son yıllarda, evcil ve vahşi hayvanlarda çok çeşitli lezyonlara neden olan papillomaviruslar, günümüzde giderek artan sayılarda tespit edilmektedir. Köpeklerde, kedilerde ve sığırlarda oluşan papillomlar veterinerlik alanında önemli bir problemi temsil etmektedir. Papillomavirus kaynaklı lezyonlar özellikle çiftlik hayvanlarında sebep olduğu bazı hastalıklar sebebiyle önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yeni viral türlerin keşfedilmesiyle, özellikle sığır ve karnivor papillomavirusların hayvan sağlığı için dünya çapında önemi artmaktadır. Papillomaviruslarla ilgili yapılan yeni keşifler kanser mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Hayvan papillomavirusları, moleküler ve hücre biyolojisi eğitiminde de önemli modeller olarak görülmektedir. Hayvan yetiştiriciliği ve veteriner tıbbı için gösterdikleri bu önemlere ek olarak, genel papillomavirus kaynaklı lezyonların patogenezinin incelenmesi ve viral enfeksiyonlar ile bunların sonuçlarını ele alan yenilikçi biyoteknolojik araçların geliştirilmesi için de önemli modellerdir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Araldi RP., Assaf SMR., Carvalho RF., Carvalho MACR., Souza JM., Magnelli RF., Modolo DG., Roperto FP., Stocco RC., Beçak W., 2017. Papillomaviruses: a systematic review. Genet Mol Biol, 40, 1-21.
2. Knipe DN., Howley PM., 2013. Fields' Virology

- Sixth Edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.,
3. Van Doorslaer KV., Chen Z., Bernard HU., Chan PK., DeSalle R., Dillner J., Forslund O., Haga T., McBride AA., Villa LL., Burk RD., 2018. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*, 99, 989-990.
 4. De Villiers EM., Fauquet C., Broker TR., Bernard HU., Zur Hausen H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
 5. ICTV (International Committee Taxonomy of Viruses), 2011. Reports-Papillomaviridae.
 6. Bravo IG., Felez-Sanchez M., 2015. Papillomaviruses viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Heal*, 28, 32-51.
 7. Dubovi E. J., Maclachlan J.N., (2017). Papillomaviridae and Polyomaviridae. *Fenner's Veterinary Virology, Academic press*, Chapter 11. 229-243.
 8. Zheng ZM., Baker CC., 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11, 2286-302.
 9. Lunardi M., Alcindo A., Alejandro R., Fernandes A., 2013. Bovine Papillomaviruses-Taxonomy and Genetic Features. In: *Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications*. InTech
 10. Van Doorslaer K., Ruoppolo V., Schmidt A., Lescroel A., Jongsomjit D., Elrod M., Kraberger S., Stainton D., Dugger KM., Ballard G., Ainley DG., Varsani A., 2017. Unique genome organization of non-mammalian papillomaviruses provides insights into the evolution of viral early proteins. *Virus Evol*, 3, 1-12.
 11. Daudt C., da Silva FR., Cibulski SP., Streck AF., Laurie RE., Munday JS., 2019. Bovine papillomavirus 24: a novel member of the genus Xipapillomavirus detected in the Amazon region. *Arch Virol*, 164, 637-641.
 12. Tan MT., Yıldırım Y., Sozmen M., Bilge Dağalp S., Yılmaz V., Kirmizigül AH., Gokce E., 2012. A histopathological, immunohistochemical and molecular study of cutaneous bovine papillomatosis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 739-744.
 13. Timurkan MO., Alcigir ME., 2017. Phylogenetic analysis of a partial L1 gene from bovine papillomavirus type 1 isolated from naturally occurring papilloma cases in the northwestern region of Turkey. *Onderstepoort J Vet*, 84, 1-6.
 14. Oğuzoğlu TÇ., Koç BT., Akkutay-Yoldar Z., Salar S., Baştan A., 2019. Detection and whole genomic characterization of Bovine Papillomavirus type 1 associated with severe mammary cutaneous warts in Turkey. *Vet Mexico*, 6(3) 1-11.
 15. Ataseven VS., Kanat Ö., Ergün Y., 2016. Molecular identification of bovine papillomaviruses in dairy and beef cattle: first description of Xi- and Epsilonpapillomavirus in Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci*, 40, 757-763.
 16. Bilge Dağalp S., Dogan F., Farzani TA., Salar S., Bastan A., 2017. The genetic diversity of bovine papillomaviruses (BPV) from different papillomatosis cases in dairy cows in Turkey. *Arch Virol*, 162, 1507-1518.
 17. Bocaneti F., Altamura G., Corteggio A., Velescu E., Roperto F., Borzacchiello G., 2016. Bovine papillomavirus: new insights into an old disease. *Transbound Emerg Dis*, 63, 14-23.
 18. Roperto S., Munday JS., Corrado F., Goria M., Roperto F., 2016. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Vet Microbiol*, 190, 1-4.
 19. Gil da Costa RM., Peleteiro MC., Pires MA., Dimaio D., 2017. An Update on Canine, Feline and Bovine Papillomaviruses. *Transbound Emerg Dis*, 64, 1371-1379.
 20. Modolo DG., Araldi RP., Mazzuchelli-de-Souza J., Pereira A., Pimenta DC., Zanphorlin LM., Beçak W., Menossi M., Stocco RC., Franco R., Carvalho RF., 2017. Integrated analysis of

- recombinant BPV-1 L1 protein for the production of a bovine papillomavirus VLP vaccine. *Vaccine*, 35, 1590-1593.
21. Campo MS., 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*, 89, 249-261.
 22. Munday JS., 2014. Bovine and Human Papillomaviruses. *Vet Pathol*, 51, 1063-1075.
 23. Jeremiah OT., Fagbohun OA., Babalo OJ., 2016. Molecular detection of bovine papilloma viruses associated with cutaneous warts in some breeds of Nigerian cattle. *Int J Biotechnol Biochem*, 12, 123-130.
 24. Forslund O., Antonsson A., Nordin P., Stenquist BO., Hansson BG., 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol*, 80, 2437-2443.
 25. Ogawa T., Tomita Y., Okada M., Shinozaki K., Kubonoya H., Kaiho I., Shirasawa H., 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol*, 85, 2191-2197.
 26. Christensen ND., Budgeon LR., Cladel NM., Hu J., 2017. Recent advances in preclinical model systems for papillomaviruses. *Virus Res*, 231, 108-118.
 27. Gil da Costa RM., Medeiros R., 2014. Bovine papillomavirus: Opening new trends for comparative pathology. *Arch Virol*, 159, 191-198.
 28. Linder KE., Bizikova P., Luff J., Zhou D., Yuan H., Breuhaus B., Nelson E., Mackay R., 2018. Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel equine papillomavirus (Ec PV 8). *Vet Dermatol*, 29, 72-e30.
 29. Torres SMF., Koch SN., 2013. Papillomavirus-associated diseases. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 29, 643-655.
 30. Kanat Ö., Ataseven VS., Babaeski S., Derelli F., Kumaş C., Doğan F., Bilge Dağalp S., 2019. Equine and bovine papillomaviruses from Turkish brood horses: a molecular identification and immunohistochemical study. *Vet Arhiv*, 89, 601-611.
 31. Borzacchiello G., 2007. Bovine papillomavirus infections in animals. *Commun Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol*, 2, 673-679.
 32. Altamura G., Jebara G., Cardeti G., Borzacchiello G., 2018. Felis catus papillomavirus type-2 but not type-1 is detectable and transcriptionally active in the blood of healthy cats. *Transbound Emerg Dis*, 65, 497-503.
 33. Dunowska M., Munday JS., Laurie RE., Hills SF., 2014. Genomic characterisation of Felis catus papillomavirus 4, a novel papillomavirus detected in the oral cavity of a domestic cat. *Virus Genes*, 48, 111-119.
 34. Munday JS., 2014. Papillomaviruses in felids. *Vet J*, 199, 340-347.
 35. Munday JS., Thomson NA., Luff JA., 2017. Papillomaviruses in dogs and cats. *Vet J*, 225, 23-31.
 36. Munday JS., Dittmer KE., Thomson NA., Hills SF., Laurie RE., 2017. Genomic characterisation of Felis catus papillomavirus type 5 with proposed classification within a new papillomavirus genus. *Vet Microbiol*, 207, 50-55.
 37. Lange CE., Favrot C., 2011. Canine Papillomaviruses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 41, 1183-1195.
 38. Günay C., Sağlıyan A., Özkaraca M., 2011. Bir köpekte oral papillomatosis ve cyclophosphamide ile sağaltımı. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 25, 135-139.
 39. Lange CE., Tobler K., Schraner EM., Vetsch E., Fischer NM., Ackermann M., Favrot C., 2013. Complete canine papillomavirus life cycle in pigmented lesions. *Vet Microbiol*, 162, 388-395.
 40. Munday JS., Tucker RS., Kiupel M., Harvey CJ., 2015. Multiple oral carcinomas associated with a novel papillomavirus in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 27, 221-225.
 41. Dogan F., Dörttaş SD., Dağalp SB., Ataseven VS., Alkan F., 2018. A teat papillomatosis case in a Damascus goat (Shami goat) in Hatay province, Turkey: a new putative papillomavirus? *Arch Virol*, 163, 1635-1642.

YAZARLARA BİLGİ

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi "Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg." dir.
2. Bu dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış Temel Veteriner Bilimleri (Anatomi, Biyokimya, Fizyoloji, Histoloji, Mesleki Etik ve Deontoloji), Klinik Öncesi Veteriner Bilimleri (Farmakoloji ve Toksikoloji, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Patoloji, Viroloji), Klinik Veteriner Bilimleri (İç Hastalıkları, Cerrahi, Doğum ve Jinekoloji, Dölerme ve Suni Tohumlama), Zootekni ve Hayvan Besleme Bilimleri (Biyostatistik, Genetik, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Hayvancılık İşletme Ekonomisi, Zootekni), Veteriner Orjinli Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Egzotik Hayvanlar Bilimi ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve derlemeler yayımlanır.
3. Materyal olarak hayvan kullanılan orijinal araştırma makalelerinde (klinik, deneysel, saha çalışmaları vb.); etik kurul onayı alınmış olmalıdır. Etik kurul onayının alındığı kurum ve onay numarası makalenin Materyal ve Metot kısmına yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.
4. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)'ına aittir.
5. Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör veya üçüncü bir hakemin görüşü alınarak karar verilir.
6. Sorumlu yazar Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisine yayımlanmak üzere göndereceği makale ile birlikte "**Makale Kontrol Formu**"nu da göndermek zorundadır.
7. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi' ne gönderilen makalelerde, makale değerlendirme süreci başladığı andan itibaren, makalede yazar ismi değişikliği ve isim sıralaması değişikliği yapılmaz.
8. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne ulaşan makale ve makale kontrol formu, dergi editörlüğüne ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.
9. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nin etik politikası gereği intihale müsamaha gösterilmemektedir. Dergiye gönderilen tüm makaleler, uygun bir yazılım kullanılarak benzerlik yönünden kontrol edilir. Benzerlik oranı %15'den fazla olan makaleler (kaynaklar hariç) reddedilir.

10. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'na belirtilen "İhbarı Mecburi Hastalıklar" ile ilgili makalelerin değerlendirmeye alınabilmesi için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan alınmış izin yazısının Dergi Editörlüğüne sunulması zorunludur.

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. Makaleler, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, şekil, tablolar ve kaynaklarda dahil olmak üzere sayfa sayısı orijinal bilimsel araştırmalarda ve derlemelerde 16, olgu sunumu gibi kısa bilimsel çalışmalarda ise 5 sayfayı geçmemelidir.

2. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır.

3. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) ve sayfa numaraları (sayfa altında ve ortalı) eklenmelidir.

4. Makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje, vb.) makale başlığının sonuna üst simge olarak * işareti konulup makale başlığı altında italik yazıyla açıklanmalıdır.

5. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Orijinal Bilimsel Araştırma Makaleleri İçin:

Birinci Sayfa: makalenin birinci sayfası başlık, yazar isimleri ve adresleri, yazarların e-posta adresleri, sorumlu yazar iletişim bilgileri ve eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgidir oluşmalıdır.

Başlık: Türkçe ve İngilizce başlıklar sadece ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Makalenin dili Türkçe ise önce Türkçe sonra İngilizce başlık, makalenin dili İngilizce ise önce İngilizce sonra Türkçe başlık yazılmalıdır.

Yazar İsimleri ve Adresleri: Yazar(lar)'ın adı ve soyadının (akademik ünvanlı) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortalı gelecek şekilde yazılmalıdır. Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ üst köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve Ülke belirtilmelidir.

Yazarların e-posta Adresleri: makalede ismi bulunan tüm yazarların ismi ve e-posta adresleri yazılmalıdır.

Sorumlu Yazar İletişim Bilgileri: Makalenin sorumlu yazarına ait isim-soyisim, e-posta, adres, telefon, GSM ve fax numaralarını içeren bilgiler yazılmalıdır.

Makale ile İlgili Açıklayıcı Bilgi: Eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje vb.) birinci sayfanın sonunda italik yazıyla açıklanmalıdır.

İkinci Sayfa: Makalenin ikinci sayfası Türkçe özet ve anahtar kelimeler ile İngilizce özet ve anahtar kelimeleri içermelidir. Makale yazım dili Türkçe ise öncelikli olarak Türkçe özet ve anahtar kelimeler; eğer makale yazım dili İngilizce ise öncelikli olarak İngilizce özet ve anahtar kelimeler sunulmalıdır.

Özet: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Anahtar kelimeler “Türkiye Bilimleri Terimleri” nden seçilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com/tr-index.html>). En fazla 5 adet olmalıdır. Türkçe anahtar kelimeler Türkçe’ye göre, İngilizce anahtar kelimeler İngilizce’ye göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Her anahtar kelime arasına (,) işareti konulup, sonuncu anahtar kelimedenden sonra (.) işareti konulmalıdır.

Üçüncü Sayfa: Makale üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “MATERYAL ve METOT”, “BULGULAR”, “TARTIŞMA ve SONUÇ”, Çıkar çatışması ve “KAYNAKLAR” bölümleri halinde tamamlanmalıdır. Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, teşekkür de eklenebilir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır. Bölümlere ait alt başlıklar yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Tüm başlıklar koyu tonda ve 12 punto ile satırbaşı hizasında yazılmalıdır.

İstatistiksel Analiz bilgileri: makalenin MATERYAL ve METOT bölümünün sonunda “İstatistiksel Analiz” başlığı altında verilmelidir.

Birimler ve Kısaltmalar: Her bir kısaltmanın açılımı metinde ilk geçtiği yerde verilmelidir. Birimler ve ölçülerde Uluslar Arası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri italik olarak yazılmalıdır. Makale içerisinde kullanılan rakamsal ve istatistiki verilerde nokta kullanılmalıdır (örnek: 44.5; 0.82; % 97.7; $P < 0.01$ vb.).

Tablo ve Şekiller: Tablo ve Şekiller ana dökümandan ayrı olarak gönderilmelidir. Tablolar Dikey sayfa olanlar genişlik 7 cm’ye sığacak şekilde en fazla 35 satır, yatay sayfaya 15 cm’ye sığacak şekilde en fazla 25 satır olmalıdır. Şekiller bulanık olmayacak şekilde, jpeg, tiff, bmp veya gif formatında ve en az 150 dpi çözünürlükte hazırlanmalı, şekil üzerine yazılan yazılar ve işaretlemeler aynı şekilde resim işleme programlarında (Photoshop, paint vs.) “Calibri” fontu ile 12 puntoyu geçmemesi gerekmektedir. Grafikler resim formatında değil doc, docx, xls veyaxlsx formatında hazırlanmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde Şekil olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1). Tablo ve şekillerin başlık ve açıklamaları hem Türkçe hemde İngilizce olarak eklenmelidir. Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü kısaltma tablo ve şekil altında açıklanmalıdır.

Sonuç: Makaleye ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Olgu Sunumları İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 120'den daha az olmamalı ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Üçüncü sayfadan itibaren "GİRİŞ", "OLGU SUNUMU" (olgu sunumu başlığı altında materyal, metot ve bulgulardan bahsedilmelidir) "TARTIŞMA ve SONUÇ" "Çıkar çatışması", ve "KAYNAKLAR" şeklinde tamamlanmalıdır.

Olgu sunumu içerisinde eğer varsa İstatistiksel analiz bilgileri, birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Olgu sunumuna ait elde edilen/varılan sonuç, "TARTIŞMA ve SONUÇ" kısmının sonunda "sonuç olarak..." ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Derlemeler İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Derlemeler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Derleme üçüncü sayfadan itibaren "GİRİŞ" ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, "SONUÇ", Çıkar çatışması ve KAYNAKLAR ile tamamlanmalıdır.

Derleme içerisinde eğer varsa birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Derlemeye ait sonuç, KAYNAKLAR bölümünden hemen önce SONUÇ başlığı altında belirtilmelidir.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne yayımlanmak üzere gönderilen derlemenin sorumlu yazarının derlemenin konusu ile ilgili en az 3 (üç) adet makalesinin olması gerekmektedir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır)

Çıkar Çatışması

Dergiye gönderilen makalenin türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme), makale içerisinde kaynaklar başlığından önce Çıkar Çatışması başlığı eklenmeli ve "yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder" ifadesi yazılmalıdır.

Kaynaklar

Kullanılan kaynak sayısı olgu sunumları için 10'dan az, araştırma makaleleri için 20'den az ve tüm makale türleri için 45'den fazla olmamalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kullanılan kaynakların (makalenin gönderildiği yıl baz alınarak) en az üçte birlik kısmı son 3 yıla ait olmalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kaynaklar aşağıda belirtildiği şekilde sunulmalıdır:

Metin içerisinde:

Metin içerisinde kaynaklara 1'den başlamak üzere numara verilmelidir ve bu numaralar (1), (1,2), (1,4-7,13) şeklinde parantez içerisinde belirtilmelidir. Yazar isminin kullanılacağı yerlerde ise yazarın soyadı ve parantez içerisinde kaynağın numarası Aktaş (22), Aktaş ve ark. (13) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

Kaynaklar Bölümünde:

Metin içerisinde numaralandırılan kaynaklar, makalenin kaynaklar bölümünde numaralarına göre sıralandırılmalıdır.

Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin isminin kısaltması kullanılmalıdır.

Kaynak makale ise; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun*, 69, 4657-4660.

Kaynak kitap ise; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

Kaynak kitapta bir bölüm ise; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, 6th ed., 230-250, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kaynak bir tez ise; Aktaş MS., 2005. Köpeklerde antibiyotiklerin neden olduğu ishallerde probiyotiklerden *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Kaynak bir kuruluşün yayını ise; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

Kaynak bir yazılım ise; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.

Web tabanlı kaynaklar kullanılmamalıdır.

MAKALENİN GÖNDERİLMESİ

Makale online sistem (<https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd>) aracılığıyla dergi editörlüğüne gönderilmelidir.

DERGİ BASKISI

Kabul edilen makaleler **ücretsiz** basılacaktır.

Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

Sorumlu yazara makalenin basıldığı sayıdan bir örnek ücretsiz olarak gönderilir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- 1.** Atatürk University Journal of Veterinary Sciences is a refereed scientific publication organ of Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences and is published tri-annually in April, October and December. The abbreviation of the journal's title is "Atatürk University J. Vet. Sci.".
- 2.** Original research papers, case reports and reviews to be submitted should be prepared either in Turkish or in English, must not be published elsewhere or submitted concomitantly to any other journal, within the scope of Veterinary Medicine and relevant Departments, i.e. Basic Veterinary Sciences (Anatomy, Biochemistry, Physiology, Histology, Occupational/Professional Ethics and Deontology), Preclinical Veterinary Sciences (Pharmacology and Toxicology, Microbiology, Parasitology, Pathology, Virology), Clinical Veterinary Sciences (Surgery, Internal Medicine, Obstetrics and Gynecology, Reproduction and Artificial Insemination), Animal Science and Nutritional Sciences (Biostatistics, Genetics, Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Animal Enterprises Economy, Animal Science), Animal-Originated Food Hygiene and Technology, with, exotic animal science and laboratory animals, are published in this journal.
- 3.** In the original research manuscripts (Clinical, Experimental, field studies, etc.), which used animals as material; ethics committee approval must be obtained. Ethics committee approval number should be written in the Material and Method section of the article. The editorial board may also request an ethics committee approval document when deemed necessary.
- 4.** Authors are responsible for complying with the copyright conditions related with the material cited (taken) from other resources or used and signing the agreement contract declaring transfer of the copyright to the journal. The full responsibility of the texts to be appeared within the journal belongs to the author(s).
- 5.** Manuscripts to be considered are sent to the two referees at least. In the article acceptance process, if the opinions of the two referees are different, the decision is made by taking the opinion of the editor or a third referee.
- 6.** The responsible author has to send the "Article Check List" along with the article to be sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication.
- 7.** We will not be able to make any changes to the author names (adding/removing authors, change of order of authors) at the manuscript send to Atatürk University Journal of Veterinary Science from the moment the manuscript evaluated process begins.
- 8.** Manuscript and manuscript check list reaching Atatürk University Journal of Veterinary Sciences Editor is subject to preliminary evaluation by a journal editor. The editorial has the right to refuse the manuscript according to the preliminary evaluation result or to request a correction before subjecting it to the referee evaluation.
- 9.** According to the ethics policy of Atatürk University Journal of Veterinary Sciences, plagiarism is not tolerated. Submitted manuscripts are subject to Similarity Index checking

using appropriate software. If the Similarity Index is more than 15% (except for references), manuscript is rejected.

10. Only for Turkish authors: In order to evaluate the articles related to “diseases which have to be notified” stated by the Ministry of Agriculture and Forestry of the Republic of Turkey, the permission letter obtained from the Ministry of Agriculture and Forestry of the Republic of Turkey must be submitted to the Journal editor.

MANUSCRIPT PREPARATION

1. Manuscripts should be written in A4-sized paper (one-sided), double-spaced, with 3 cm space from the margins of the paper and should not exceed 16 pages for original scientific researches and reviews or 5 pages for short scientific studies such as case reports.

2. Manuscript should be prepared using Microsoft Word 6.0 or upper versions, in Calibri characters with 12 point typing size.

3. Line numbers (be started from the 2nd page onwards) and page numbers (at the middle of the bottom of the page) should be given in the manuscript.

4. Details (thesis, project, etc.) related with the manuscripts should be given at the end of the title of the manuscript with the sign of superscript (*) with further explanation below the title in italic format.

5. Trademarks of substances (materials) and products of the subject of the study should not be used.

For Research Articles:

First page: The first page of the manuscript should contain title, authors' name-surname and addresses, e-mail addresses of the authors, corresponding authors' explanatory details related with the manuscripts, if any.

Title: Titles in Turkish and English should be written in small letters with only the first letter to be in capital. In case of the Turkish language of the main text, firstly titles in Turkish then in English should be given, while the opposite should be given for manuscripts written in English.

Names of authors and addresses: The first letters of name and surnames (without academic titles) of author(s) should be written in capital and aligned at the middle below the title. Corresponding author (*) should be pointed, a value should be added as a superscript at the right and these values should be used in the section of addresses. In that section, the body/authority, unit/department, city and country of the authors should be described.

E-mail addresses of the authors: All the names and e-mail addresses of authors mentioned within the manuscript should be written.

Contact details of the corresponding author: The name-surname, e-mail, address, phone, mobile and fax numbers of the corresponding author should be written.

Explanatory details of the manuscripts: If any, the explanatory details (thesis, project, etc.) should be written in *italic* letters at the end of the first page.

Second page: The second page of the manuscript should contain summary and keywords.

Summary: Briefly, it should contain the aim, material, method, results and conclusions. The number of word to be used should be between 170-200 words and be written in single-space.

Keywords: The number of keywords should be 5 at maximum in the alphabetic order. Between each of the words, a comma (,) sign should be put while a full stop (.) sign should be put at the end of the last one.

Third page: From this page onwards, the manuscript should continue with the sections of “INTRODUCTION”, “MATERIALS and METHODS”, “RESULTS”, “DISCUSSION and CONCLUSION”, “Conflict of interest”, REFERENCES in the following order. The sections of results and discussion may be given together. A section of acknowledgement may also be added, if needed. Section titles should be written in capital letters. Sub-headings of the sections should be written with the first letters in capital only and aligned with the beginning of paragraph. All the headings should be written in black 12-point typing-size and aligned with the beginning of paragraph.

Data from Statistical analyses: This section should be given at the end of MATERIALS and METHODS section and under the title of “Statistical Analysis”.

Units and Abbreviations: The meaning of each abbreviation should be given where it appears first. For units and measurements, International Standard units (SI-system) should be used. The names of genus (breeds) and species should be written in italic style. For numerical and statistical values, full stop (.) sign should be used (e.g. 44.5; 0.82; 97.7 %; $P < 0.01$, etc.).

Tables and Figures: Figures, graphics, photos and pictures/plates within the headings and text should all be given as Figure. Figures and tables should be numbered according to their orders within the text and written without any abbreviation within the paragraph (e.g. Figure 1, Table 1). Tables and figures should be placed into the sections appropriately, and their headings and explanations should also be included in Turkish and English. All types of abbreviations used within tables and figures should be explained below them.

Conclusion: The ultimate result obtained should be described as “In conclusion,…” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Case Reports:

The first and second pages should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The number of words to be used in summary should not be less than 120 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, INTRODUCTION, CASE REPORT (materials, methods and results should be mentioned under the title of case report) should be followed by “DISCUSSION and CONCLUSION” “Conflict of interest” and REFERENCES.

If any, data from the statistical analysis, units and abbreviations, tables and figures should be presented as given for scientific research manuscripts.

For case report, the ultimate result obtained should be described as “In conclusion,...” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Reviews:

The first and second pages of reviews should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The summary should involve data on the subject and aim of the review. The number of words used in summary should be between 170-200 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, reviews should start with “INTRODUCTION”, continue with subheadings to be determined by the author(s) and be completed with “CONCLUSION” “Conflict of interest” and REFERENCES.

If any, the units and abbreviations, tables and figures within the review should be presented as given for scientific research manuscripts.

For reviews, the ultimate result should be described as CONCLUSION section in a single paragraph just before the section for REFERENCES.

The corresponding author of the compilation sent to the Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must have at least 3 articles on the subject of the compilation. The corresponding author must send the citation information of relevant articles related to the subject along with his/ her article (relevant article citations must be presented on the last page of the article)

Conflict of interest

Regardless of the type of manuscript submitted to the journal (original research article, case report, review), the title of Conflict of Interest should be added before the references in the article and “the authors declare that there is no conflict of interest”.

References

The number of references used must not be less than 10 for case reports, less than 20 for research articles, and more than 45 for all article types.

Regardless of the type of article (original research article, case report, review), at least one-third of the references used (based on the year the article was submitted) must belong to the last three years.

Regardless of the type of manuscript (original research paper, case report, review), references should be given, as follows:

For Text section:

Within the text, reference numbers should be given as numbers starting from 1, and these numbers should be indicated within the brackets as (1), (1,2), and/or (1,4-7,13). Where the name of the author is to be given, the surname of the author and reference number should be written as Aktas (22), and/or Aktas et al. (13).

For References section:

The references given within the text should be given as numbers in numerical order within the reference section.

For writing the scientific journals, its international title recommended by the journal should be used. The journal title abbreviation must not be used.

For articles; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity*, 69, 4657-4660.

For books; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th edn., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

For chapters of a book; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, 6th edn., 230-250, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

For theses; Aktas MS., 2005. Efficacy of *Saccharomyces Boulardii* as a probiotic in Dogs with lincomycin induced diarrhoea. Ankara University, Graduate School Health Science, Turkey.

For publications of a Foundation; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

For softwares; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th edn., SAS Institute, Cary.

Web-based references should not be used.

MANUSCRIPT SUBMISSION

The manuscript must be sent to the journal editor through online system (<https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd>).The file names of original manuscripts and tables should involve a “.doc” extension.

Figures (graphs, photos, figures and pictures/plates) should be submitted, as a separate file, in JPEG format with 300 DPI resolutions.

JOURNAL’S PRESS

Manuscript accepted for publication will be published free of charge.

No offprints will be sent to the authors.

A copy of the issue of the journal with the article is sent for free to the corresponding author of the article.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

YAYIN HAKLARI DEVRİ SÖZLEŞMESİ

Makale Türü: () Araştırma () Derleme () Olgu Sunumu () Diğer

Makale Başlığı:.....

.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

**Yazarın Adı ve Soyadı
(Makaledeki İsim Sırasına Göre)**

İmza

Tarih

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Telefon/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra e-posta adreslerimizden herhangi birine gönderiniz.

DERGİ ADRESİ

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

Tel: +90 442 2360880, Fax: +90 0442 2360881, E-posta: veterdergisi@atauni.edu.tr/ atavetderg@hotmail.com

ATATÜRK UNIVERSITY JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT DECLARATION FORM

Type of Manuscript: () Research () Review () Case Report () Other
Title of Manuscript:.....
.....

We, as the authors of manuscript having type and title aforegiven, declare that; i) this manuscript submitted to The Editor of Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication, as prepared in complying with the instructions for authors, is original, ii), it has not been published partially or totally or submitted synchronously to other publishing body, iii) all the possible scientific and ethical responsibilities, without any further responsibility of The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences at all, following the publication of manuscript are belong to us, iv) we transfer all the copyrights along with the corrections recommended by the advisor and Editor to The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences following the date of publication of the manuscript.

However, other than the copyright conditions described; i) the authenticated rights (such as patent), ii) the right of use of the manuscript, totally or partially, for scientific activities such as books and lectures, with no charge and iii) dissemination of the manuscript by the authors without commercial purposes are all reserved.

	Name and Surname of the author (in the manuscript's order)	Signature	Date
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:.....Signature:.....

Note: Please send the form to either of our e-mail addresses after filling in the blanks.

JOURNAL'S ADDRESS

Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences, The Editor of Atatürk University J. Vet. Sci., 25240-Campus/Erzurum-TURKEY

Phone: +90 442 2360880, Fax: +90 0442 2360881, E-mail: vetdergisi@atauni.edu.tr or atavetderg@hotmail.com

Araştırma Makaleleri / Research Articles

▶ Askan Arslan, Ali Haydar KIRMIZIGÜL. Serum Amyloid-A, Haptoglobin and Ceruloplasmin Levels in Dogs Infected with <i>Sarcoptes canis</i> (<i>Sarcoptes canis</i> ile Enfekte Köpeklerde Serum Amiloid-A, Haptoglobin ve Seruloplazmin Seviyelerinin Belirlenmesi).	1-6
▶ Farid MAHD-GHAREHBAGH, Siamak KAZEMI-DARABADI, Hamid AKBARI. Prevalence of Foot Lesions Among the Slaughtered Cattle in the Northwest of Iran (<i>İran'ın Kuzeybatısında Kesilen Büyükbaş Hayvanlarda Ayak Lezyonlarının Görülme Sıklığı</i>).	7-13
▶ Ramzi Abdulghafoor Abood AL-AGELE. The Study of Histological Observations of Ovine Claw Coronary Region and the Architecture Morphology of Arterial Anastomosis of This Area (<i>Koyun Tırnak Koroner Bölgesinin Histolojik İncelemesi ve Arteriyel Anastomozunun Yapısal Morfolojisi</i>).	14-21
▶ Aykut ULUCAN, Hayati YUKSEL, Emre SAHİN, Seda YAKUT. The Role of Serum Amyloid-A in Formaldehyde-Induced Kupffer Cell Apoptosis in Rats and Possible Protective Effects of Astaxanthin in This Process (<i>Serum Amiloid-A'nın Sıçanlarda Formaldehit Kaynaklı Kupffer Hücre Apoptozundaki Rolü ve Astaksantin'in Bu Süreçteki Olası Koruyucu Etkileri</i>).	22-30
▶ Nurcan DONMEZ, Ercan KESKİN, Mehmet OZSAN, Omer Mahruf Ali SHOSHİN, Bekir MEHTAP. The Favorable Effect of Swimming on Some Blood Parameters in Diabetic Rats (<i>Dişabetik Sıçanlarda Yüzmenin Bazı Kan Parametreleri Üzerine Olumlu Etkisi</i>).	31-37
▶ Israa Abdulghani AL-ROBAİEE, Maab İbrahim AL-FARWACHİ. Some Clinicopathological Changes in Buffalo Calves Infected with Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) K99 ⁺ Detected by Direct ELISA (<i>Direkt ELISA ile Tanısı Konmuş, Enterotoksijenik E. coli (ETEC) K99⁺ ile Enfekte Manda Yavrularındaki (Malak) Bazı Klinikopatolojik Değişiklikler</i>).	38-42
▶ Emin KARAKURT, Serpil DAG. Protective Effect of Silymarin on Diethylnitrosamine Induced Hepatocellular Carcinoma Model in Wistar Rats; Cancer Patterns and Cytological Variants (<i>Wistar Ratlarında Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Hepatoselüler Karsinom Modelinde Silimarin'in Koruyucu Etkisi; Kanser Paternleri ve Sitolojik Varyantlar</i>).	43-50
▶ Korhan ÖZTURAN, Mustafa ATASEVER. Erzurum ve Çevresinde Üretilen Süt ve Süt Ürünlerinin Mevsimlere Göre Mineral Madde ve Ağır Metal İçeriği (<i>Mineral and Heavy Metal Contents of Milk and Milk Products Produced in Erzurum Province According to Seasons</i>).	51-62
▶ Zekeriya ÖZÜDOĞRU, Hatice ÖZDEMİR. Hasak Koyunlarının Akciğer Damarları Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma (A Macroanatomic Study on Lung Vessels in Hasak Sheep).	63-69
▶ Sedat ÇETİN, Ayşe USTA, Pınar EKİCİ, Semiha DEDE, Veysel YÜKSEK. <i>Sarcoptes ovis</i> ile Enfekte Koyunlarda Serum Protein Fraksiyon Profili (<i>Serum Protein Fraction Profile in Sheep Infected with Sarcoptes ovis</i>).	70-75
Derlemeler / Reviews	
▶ Fırat KORKMAZ, Beste ÇİL. Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı (<i>The Use of Flow Cytometry in Semen Quality Analyses</i>).	76-83
▶ Damla Tuğçe OKUR, Bülent POLAT. Kedi ve Köpeklerde Sezaryen ve Piyometra Operasyonlarında Anestezi Teknikleri (<i>Anesthesia Techniques in Cesarean and Pyometra Operations in Cats and Bitches</i>).	84-90
▶ Selvi Deniz DÖRTTAŞ, Seval BİLGE DAĞALP. Veteriner Hekimlikte Papillomaviruslar ve Önemi (<i>Papillomaviruses and Their Importance in Veterinary Medicine</i>).	91-99