

e-ISSN 2146-7188

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine*

YIL/YEAR: 2020 CİLT/VOLUME: 9 SAYI/ISSUE: 1

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of The Faculty of Veterinary Medicine



Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty Of Veterinary Medicine

YIL/YEAR:2020

CİLT/VOLUME:9

SAYI/ISSUE:1

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

**Harran Üniversitesi**  
**Veteriner Fakültesi Adına**  
**Sahibi/Owner**  
Prof. Dr. Murat SEVGİLİ  
**Dekan/Dean**

**Baş Editör/Editor in Chief**  
Prof. Dr. Oktay KESKİN

**Editörler Kurulu/Editorial board**  
Prof. Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI  
Doç. Dr. Şükrü GÜRLER  
Doç. Dr. Rahşan YILMAZ  
Doç. Dr. Deniz KORKMAZ  
Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN  
Doç. Dr. Birten EMRE

**İngilizce Editörü/English Editor**  
Prof. Dr. Ayşe Menteş GÜRLER

**Mizanpaj Editörü/Layout Editor**  
Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK

**Dergi Sekreteri/Journal Secretary**  
Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE

## **Yazışma /Correspondence**

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dergisi Editörlüğü Eyyübiye Kampüsü,  
63200 - Şanlıurfa/TÜRKİYE  
Tel: +90 414 318 38 59  
+90 414 318 38 55  
Faks: +90 414 318 39 22

e-mail: harranvet@gmail.com

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dergisi Hakemli Bir Dergi Olup, Yılda 2(iki)  
Sayı Olarak Yayınlanır.

Yıl/Year: 2020 - Cilt/Volume: 9 Sayı/Issue 1

## **Danışma Kurulu/Advisory Board**

Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.  
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Atatürk Üniv. Vet. Fak. Erzurum, Türkiye.  
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Halil Selçuk BİRİCİK, Aksaray Üniv. Vet. Fak. Aksaray, Türkiye.  
Prof. Dr. Ali BUMİN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın Türkiye.  
Prof. Dr. Hasan EREN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Anila HODA, Agric. Uni. of Tirana, Fac. of Agric.& Environ. Tirana, Albania.  
Prof. Dr. Osman KUTSAL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.  
Prof. Dr. Manzoor Ur Rahman MIR, SKUAST Kashmir Fac. of Vet. Sci. & Anim. Husbandry. Kashmir, India.  
Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Rahşan ÖZEN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Gerald REINER, Justus-Liebig Uni. Fac. of Vet. Med. Giessen, Germany.  
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2020 Yılı 9. Cilt 1. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)**  
**The Referees List of This Issue (in alphabetical order)**

Prof. Dr. Ahmet GÜNER	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Artay YAĞCI	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Milas Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan BAŞTAN	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Emine BAYDAN	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Göknur TERZİ GÜLEL	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Haluk ÇELİK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hayri EKİCİ	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Murat KANBUR	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mustafa ARICAN	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Osman Yaşar TEL	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Özgür AKSOY	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Özgür İŞLEYİCİ	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Sinan İNCE	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Dilek AKŞİT	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Duygu BAKİ ACAR	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ebru YILDIRIM	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Erhan ÖZENÇ	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hüseyin Avni KIRMACI	Karabük Üniversitesi Safranbolu Turizm Fakültesi
Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Kıvanç İRAK	Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Latif Emrah YANMAZ	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mehmet CENGİZ	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mehmet Önder KARAYİĞİT	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Musa KORKMAZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Nihat YUMUŞAK	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Figen SEVİL KİLİMCİ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Nüket BİLGİN	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Oya GİRİŞGİN	Uludağ Üniversitesi Karacabey Meslek Yüksek Okulu
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Mert POLAT	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ömer Gürkan DİLEK	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Tuncer KUTLU	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ulaş ACARÖZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi ZEYNEP BOZKAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi



**İçindekiler / Contents**

**Araştırma Makaleleri / Research Articles**

**Sayfa /Page**

1. Mardin’de Satılan Çiğ Sütlerin Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri  
Some Physicochemical and Microbiological Properties of Raw Milk Sold in Mardin  
**Aslı ÇELİKEL GÜNGÖR, Semra GÜRBÜZ, Musa Serdar AKIN, Mutlu Buket AKIN, Büşra PALABIÇAK** 1-5
2. A New Primer for PCR-RFLP Analysis of A and B Genetic Variant of Bovine Kappa- Casein  
Sığır Kappa-Kazeinin A ve B Genetik Varyantlarının PCR-RFLP Analizi için Yeni Bir Primer  
Dizaynı  
**Mevlüt ARSLAN** 6-11
3. Sütçü İneklerde Subklinik Mastitislerde Meme İçi Ozon Tedavisinin İyileştirici Etkisi  
The Recovery Effect of Intramammary Ozone Therapy for Subclinical Mastitis in Dairy Cows  
**İbrahim DOLĞUN, Mustafa Kemal SARIBAY, Erhan TEK** 12-18
4. Macroanatomic Examination of the Trachea and Syrinx in Budgerigars and Canaries  
Muhabbet Kuşları ve Kanaryalarda Trachea ve Syrinx’in Makroanatomik ve Histolojik  
İncelenmesi  
**Ozan GÜNDEMİR, Hasan ALPAK** 19-23
5. Düvelerde Gebeliğin Son Döneminde Uygulanan Vitamin E ve Selenyumun Postpartum  
Dönem Problemleri Üzerine Etkisi  
Effect of Prepartum Treatment of Vitamin E and Selenium on Postpartum Reproductive  
Problems of Dairy Heifers  
**Feyyaz KOCAARSLAN, Hayrettin ÇETİN** 24-28
6. Deneysel Diyabetik Nefropatide Patomorfoloji ve Apoptozis  
Pathomorphology and Apoptosis in Experimental Diabetic Nephropathy  
**Nihat YUMUŞAK** 29-35
7. Sığır Brusellozunun Teşhisi İçin Sütte İndirekt ELISA’nın Kullanımının Değerlendirilmesi  
Evaluation of Using ELISA in Milk for Diagnosis of Brucellosis in Cattle  
**İbrahim ÇADIRCI, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK** 36-41
8. Investigation of The Effects of Silymarin on Valproic Acid-Induced Kidney Damage in Rats  
Sıçanlarda Valproik Asitin İndüklediği Böbrek Hasarı Üzerine Silimarinin Etkileri  
**İbrahim AKTAŞ, Dilek BAYRAM** 42-48
9. Şanlıurfa’da Üretilen Urfa Peynirlerinde Nikel Düzeyleri  
Nickel Levels in Urfa Cheeses Produced in Şanlıurfa  
**Serap KILIÇ ALTUN, Nilgün PAKSOY** 49-52
10. Effects of Oral and Topical Momordica Charantia-Propolis Premix on Wound Healing  
Momordica Charantia-Propolis Premiksinin Yara İyileşmesinde Oral ve Topikal Etkileri  
**Elif DOĞAN, Güler YENİCE, Semir GEDİKLİ, Sıtkıcan OKUR** 53-58
11. Şanlıurfa İlinde Isı Stresindeki İneklerde Bazı Ovulasyon Senkronizasyon Yöntemlerinin  
Gebelik Oranlarına Etkisi  
The Effect of Different Ovulation Synchronization Methods on Fertility in Cows with Heat  
Stress in Şanlıurfa province  
**Zekiye ÇENET, Ömer KORKMAZ** 59-63

12. Sığır Kas ve Böbrek Dokularında Antibiyotik Kalıntılarının Araştırılması  
Investigation of Antibiotic Residues in Muscle and Kidney Tissues of Cattle  
**Semra GÜRBÜZ** 64-68
13. The Effect of Plantain Active Ingredient Aucubin on Isolated Rat Smooth Muscle Tissue and Primary Cell Lines  
Sinir Otu Etkin Maddesi Aucubinin İzole Rat Düz Kasları ve Primer Hücre Hatları Üzerine Etkisi  
**Emre ARSLANBAŞ, Haki KARA, Nergiz Hacer TURGUT, Hüseyin GÜNGÖR, Halef Okan DOĞAN, Mustafa Ozan ATASOY, Alper Serhat KUMRU** 69-74
14. Floresans Işımaya Bağlı Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Belirlenmesi  
Determination of Minimal Inhibition Concentration (MIC) by Fluorometry-based Method  
**Erman Oryaşın** 75-81  
**Olgu Sunumu/Case Report**
15. Simental Irkı Bir Buzağıdaki Üretral Dilatasyon Olgusunun Klinik, Radyolojik, Ultrasonografik Tanısı ve Tedavisi  
Clinical, Radiological, Ultrasonographic Diagnosis and Treatment of Urethral Dilatation Case in a Simental Calf 82-85  
**Cihan GÜNAY, Eren POLAT, Aydın SAĞLIYAN**  
**Derleme/Review**
16. Kök Hücreler ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları  
The Stem Cells and Their Usage In Veterinary Medicine  
**Osman BULUT, Ali BELGE** 86-89
17. Eye Cases Requiring Emergency Intervention in Animals  
Hayvanlarda Acil Girişim Gerektiren Göz Olguları  
**Ünal YAVUZ, Kerem YENER, Ali HAYAT** 90-97

## Mardin’de Satılan Çiğ Sütlerin Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Aslı ÇELİKEL GÜNGÖR<sup>1,a\*</sup>, Semra GÜRBÜZ<sup>1,b</sup>, Musa Serdar AKIN<sup>2,c</sup>, Mutlu Buket AKIN<sup>2,d</sup>, Büşra PALABIÇAK<sup>2,e</sup>

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-0583-295X, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-7099-0308, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-7569-1983, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0001-8307-8521, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-0983-8577

<sup>1</sup>Mardin Artuklu Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Mardin, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 07.11.2019

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Özet:**Bu çalışmada Mardin’de satışa sunulan toplam 40 çiğ süt örneğinin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir. Süt örneklerinin pH değerinin ortalaması 6.56, titrasyon asitliğinin %0.191, yoğunluğunun 1.029 g ml<sup>-1</sup>, kurumadde miktarının %12.46, yağsız kurumadde miktarının %8.89, yağ miktarının %3.57, protein miktarının %3.07, kül miktarının %0.72, TAMB sayısının 6.62 log kob ml<sup>-1</sup>, koliform bakteri sayısının 4.98 log kob ml<sup>-1</sup> ve küf-maya sayısının 4.87 log kob ml<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen çiğ süt örneklerinde yapılan analizlerde örneklerin kalitelerinin yeterli düzeyde olmadığı, önemli bir kısmının (%95’inin) Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ’ine uymadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Süt, Mikrobiyolojik özellik, Fizikokimyasal özellik.

### Some Physicochemical and Microbiological Properties of Raw Milk Sold in Mardin

**Abstract:** In this study, some physicochemical and microbiological properties of 40 raw milk samples sold in Mardin were investigated. As the average of the milk samples examined pH value 6.56, titration acidity 0.191%, density 1.029 g ml<sup>-1</sup>, dry matter amount 12.46%, dry fat content 8.89%, fat amount 3.57%, protein amount 3.07%, ash amount 0.72%, the number of total aerob mesophilic bacteria was 6.62 log cfu ml<sup>-1</sup>, the number of coliform bacteria was 4.98 log cfu ml<sup>-1</sup> and the number of mold-yeast was 4.87 log cfu ml<sup>-1</sup>. In the analysis of raw milk samples, it was determined that the quality of the samples was not sufficient and that a significant part (95%) did not comply with the Turkish Food Codex Communiqué on the Supply of Raw Milk.

**Keywords:** Milk, Microbiological properties, Physicochemical properties.

### Giriş

Süt içeriğindeki immüno globulinler, enzimler, enzim inhibitörleri, hormonlar, antibakteriyel ajanlar gibi protein ve peptid yapılı öğeler ile yağ asitleri, vitamin ve minerallerden dolayı canlının büyüme ve gelişmesinde önemli bir role sahiptir (Beykaya ve ark., 2017; Fox ve McWeeney, 2003; Maijala, 2000; Miller ve ark., 2000). Ayrıca süt mikroorganizma için de iyi bir gelişme ortamıdır. Özellikle çiğ süte üretim ve depolanması sırasında bulaşan çeşitli mikroorganizmalar, hızlı bir şekilde gelişmekte ve sütte istenmeyen değişikliklere neden olabilmektedir. Bu nedenle süt, sağımın hemen ardından soğutulmalı ve içme sütüne ya da diğer süt ürünlerine işlenmelidir (Köşer ve Tunail, 1985; Tekinşen, 1996).

Ülkemizde üretilen süt miktarı 22 milyon ton civarındadır (TÜİK, 2018). Türkiye’de üretilen sütün yaklaşık %49’u yakını sanayide işlenerek tüketime sunulmakta, %32’si hanede içme sütü ve süt ürünü (peynir, yoğurt vb.) şeklinde kullanılmakta ve %11’i

mandıralar dışında direk olarak satılmaktadır (Anonim, 2016). Herhangi bir ısıtma işlemi (pastörizasyon ve UHT) geçirmemiş süt (çiğ süt/sokak sütü/ açık süt) uygun koşullarda sağlanmadığında ve depolanmadığında insan sağlığını tehdit eden çeşitli hastalık etkenlerini içerebilmektedir (Akın ve ark., 2016). Ülkemizde süt ve süt ürünlerine ait standartlar ve bu standartların denetlenmesine dair yasa ve yönetmelikler olmasına rağmen üretilen sütün büyük bir kısmının uygun olmayan koşullarda tüketiciye ulaşması halk sağlığı açısından sorun oluşturmaktadır (Kesenkaş ve Akbulut, 2010). Ülkemizde çiğ sütün yerel perakendeciler tarafından son tüketiciye arzına ilişkin hususlar Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ’de belirtilmektedir (Anonim, 2017). Bu çalışmada, Mardin’de yerel perakendeciler tarafından satışa sunulan çiğ inek sütlerinin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin tespit edilmesi ve sütlerin kalitesinin değerlendirilmesi

amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların daha önce yapılan benzer araştırmalar ile karşılaştırılmasıyla çiğ sütlerin (sokak sütü) kalitelerinde bir gelişme olup olmadığını belirlenecektir. Ayrıca araştırmamız satışa sunulan çiğ sütlerin Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ'e uygunluğunu ortaya koymak açısından önem taşımaktadır.

## Materyal ve Metot

Araştırmanın materyalini Şubat 2018 tarihinde Mardin'de farklı noktalarda satışa sunulan toplam 40 çiğ inek sütü oluşturmuştur. Süt örnekleri 500 ml'lik steril cam şişelere yaklaşık 200–300 ml kadar alınmış ve soğukta muhafaza edilerek, Mardin Artuklu Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu laboratuvarlarına getirilmiş ve sütlerde aşağıda belirtilen analizler yapılmıştır.

**Fizikokimyasal analizler:**Çiğ sütlerinin pH değerleri pH metre kullanılarak, asitlik değeri alkali titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir (Oysun, 2011). Çiğ sütlerde kurumadde oranı gravimetrik yöntemle göre ve yağ oranı 0-8 taksimatlı özel süt bütirometresi ile Gerber yöntemine göre belirlenmiştir (Anonim, 1989; IDF, 1982). Süt örneklerinde yağsız kurumadde oranı, toplam kurumadde değerinden yağ değerinin çıkarılmasıyla belirlenmiştir (Metin, 2010). Protein oranı, mikro Kjeldahl yöntemi ile azot miktarlarının saptanması ve bulunan azot miktarının 6,38 faktörü ile çarpılması ile hesaplanmıştır (Metin, 1998). Süt örneklerinde yoğunluk tayini laktodansimetre ile saptanmıştır (Oysun, 2011).

**Mikrobiyolojik Analizler:**Süt örnekleri toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısının belirlenmesi amacıyla Plate Count Agar, (Merck) koliform bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla Violet Red Blie Agar (Merk) ve maya-küf sayısının belirlenmesi amacıyla Potato Dextrose Agar besiyerine dökme plak yöntemi kullanılarak paralel ekim yapılmıştır. Petri kutuları TAMB sayımı için 32°C'de 48 saat, koliform bakteri sayımı için 37°C de 24 saat süre ve küf-maya sayımı için 25°C de 5 gün inkübe edilmiş ve sayım sonuçlar logaritmik transformasyona tabii tutulduktan sonra log kob ml<sup>-1</sup> olarak verilmiştir (Köşer ve Tunail, 1985).

## Bulgular

Araştırmada incelenen süt örneklerinin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine ait değerler Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda çiğ süt örneklerinin ortalama pH değeri 6.56, titrasyon asitliği %0.191, yoğunluğu 1.029 g ml<sup>-1</sup>, kurumadde miktarı %12.46, yağsız kurumadde miktarı %8.89, yağ miktarı %3.57,

protein miktarı %3.07, kül miktarı %0.72 olarak belirlenmiştir. Örneklerin TAMB sayısının 6.62 log kob ml<sup>-1</sup>, koliform bakteri sayısının 4.98 log kob ml<sup>-1</sup> ve küf-maya sayısının 4.87 log kob ml<sup>-1</sup> olduğu saptanmıştır.

**Tablo 1.** Süt örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

	pH	Asitlik (%LA)	Yoğunluk (g ml <sup>-1</sup> )	Kurumadde (%)	Yağsız Kurumadde (%)	Yağ (%)	Protein (%)	Kül (%)
En düşük	6.28	0.133	1.023	10.96	8.34	2.00	2.41	0.61
En yüksek	6.80	0.276	1.033	13.85	9.89	4.50	3.66	0.83
Ortalama	6.56	0.191	1.029	12.46	8.89	3.57	3.07	0.72

**Tablo 2.** Süt örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri

	Toplam Aerob		
	Mezofilik Bakteri (log kob ml <sup>-1</sup> )	Koliform Bakteri (log kob ml <sup>-1</sup> )	Maya-Küf (log kob ml <sup>-1</sup> )
En düşük	4.30	2.00	3.00
En yüksek	8.66	6.75	7.65
Ortalama	6.62	4.98	4.87

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda çiğ sütlerin taşınması gereken özellikler Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ'de belirtilen değerler kapsamında değerlendirilmiştir (Anonim, 2017). Bu tebliğ kapsamında çiğ inek sütlerinin titrasyon asitliği değerlerinin % süt asidi cinsinden %0.135-0.200 arasında, protein değerlerinin en az %2.8, yağ değerinin en az %3.4, yağsız kurumadde değerinin en az %8.5 ve yoğunluğunun 1.028 g ml<sup>-1</sup> olması gerektiği belirtilmiştir. Aynı tebliğde çiğ inek sütünün tesadüfi örnekleme ile yapılan kontrollerde toplam canlı bakteri sayısının 30°C'de 100.000 adet ml<sup>-1</sup>'den daha düşük olması gerektiği bildirilmiştir (Anonim, 2017).

**pH değerleri:**Sütün pH değeri sütün disosiyasyon kısmında hidrojen iyonlarının miktarı ve aktivitesine bağlı olarak ürünün kalitesi ve randımanı hakkında bilgi sahibi olunması açısından önem taşımaktadır. Yeni sağılmış inek sütünün pH değeri 6.6-6.8 arasındadır. Sütün pH değerinin 6.8'in üzerinde olması mastitis hastalığının ya da süte nötrale edici madde ilavesinin 6.5'in altında olması ağız sütünün ya da aşırı asitlik artışının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Metin, 2005). Mardin'de satışa sunulan çiğ süt örneklerinin pH değerinin 6.28 ile 6.80 arasında değiştiği ve ortalama değerin 6.56 olduğu tespit edilmiştir. Göncü ve ark. (2017), Şanlıurfa'da satışa sunulan sokak sütlerin ortalama pH değerlerinin yaz ve kış dönemlerinde sırasıyla 6.54 ve 6.46 olduğunu bildirmişlerdir. Kesenkaş ve Akbulut (2010), İzmir'den toplanan çiğ süt örneklerinin pH değerinin 6.30 ile 7.00 arasında



olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda belirlenen çiğ süt pH değerleri, Göncü ve ark. (2017) ile Kesenkaş ve Akbulut (2010) buldukları değerler ile benzerlik göstermektedir.

**Titrasyon Asitliği Değeri:**Sütün asitliği önemli kalite parametrelerinden biridir. Sütün asidik özelliği içeriğinde bulunan albümin, globülin, karbondioksit, kazein, fosfat ve sitratlardan kaynaklanmaktadır. Sütte bulunan başta laktik asit bakterileri olmak üzere mikroorganizmalar süttün depolanması sırasında sütte bulunan laktozun laktik asite dönüşmesine neden olmakta ve süt asitliğini etkilemektedir. Sütün asitlik değerinin laktik asit cinsinden %0.200'nin üzerinde olması sütte mikrobiyal gelişmenin fazla olduğunu, %0.110'nın altında olması negatif bir mikrobiyal gelişmenin, hayvanda meme hastalığının ya da yanlış yemleme uygulamasının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Kesenkaş ve Akbulut, 2010). Ayrıca sütte asitliğin fazla düşük olması soda veya hidrojen peroksit gibi koruyucu maddelerin katıldığı kuşkusuna neden olmaktadır (Kurt ve ark., 1993; Metin, 2005). Çalışmada analize alınan süt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin laktik asit cinsinden minimum %0.133 ve maksimum %0.276 olduğu tespit edilmiştir. Sütlerin ortalama asitlik değerinin %0.191 olarak belirlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde Beykaya ve ark. (2017), 50 adet çiğ süt örneğinin asitlik değerlerinin laktik asit cinsinden %0.135 ile %0.495 arasında, ortalama değerin %0.233 olduğunu, Akın ve ark. (2016), Adıyaman ilinde mevsimsel olarak toplanan çiğ sütlerde ortalama asitlik değerinin çiftlik sütlerinde %0.161 ile %0.170 arasında ve sokak sütlerinde %0.182 ile %0.220 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Mardin'den toplanan çiğ süt örneklerinin 10 tanesinin Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ'de belirtilen değerlere uygun olmadığı ve sonuçların Beykaya ve ark. (2017) ile Akın ve ark. (2016) buldukları sonuçlar ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

**Yoğunluk Değeri:** Sütün yoğunluğu süttün bileşiminde bulunan maddelerin etkisine göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle süte yapılan hilelerin tespit edilmesinde süttün yoğunluğundan yararlanılır. İnek süttünün yoğunluğu 1.028-1.039 g ml<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Sütün yağ miktarı arttıkça yoğunluk düşmekte, protein, laktoz ve mineral madde miktarı arttıkça yoğunluk artmaktadır (Demirci ve ark., 2010). Mardin'de satışa sunulan çiğ sütlerinin yoğunluk değerleri en düşük 1.023 g ml<sup>-1</sup> ile en yüksek 1.033 g ml<sup>-1</sup> olduğunu ve örneklerin 2 tanesinin tebliğde belirtilen en az 1.028 g ml<sup>-1</sup> değerinin altında olduğu belirlenmiştir. Çalışmada çiğ sütlerinin yoğunluk değeri ortalama 1.029 g ml<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç farklı araştırmacıların inceledikleri çiğ sütlerinin ortalama yoğunluk değerleri ile 1.0291 g

ml<sup>-1</sup> (Özrenk ve Bayar, 2008), 1.0290 g ml<sup>-1</sup> (Aydın ve ark., 2010), 1.0287 g ml<sup>-1</sup> (Dilber ve Baran, 2014) ve 1.0282 g ml<sup>-1</sup> (Beykaya ve ark., 2017) benzerlik göstermektedir.

**Kurumadde ve Yağsız Kurumadde Miktarı:** Sütte suyun dışındaki toplam bileşenler kurumadde olarak isimlendirilir. Süte yapılan bazı hileler kurumadde miktarının değişmesine neden olabildiğinden dolayı önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Kurt ve ark., 1981). Bu nedenle süt kurumadde değerlendirilmesi kurumadde ve yağsız kurumadde miktarı şeklinde yapılabilmektedir. Çalışmada incelenen örneklerin kurumadde miktarı en düşük %10.96, en yüksek %13.85 ve ortalama %12.46 olarak tespit edilmiştir. Örneklerin yağsız kurumadde miktarlarının en düşük %8.34 en yüksek %9.89 ve ortalama %8.89 olduğu saptanmıştır. İncelenen örneklerin 4 tanesinin yağsız kurumadde içeriklerinin tebliğde belirtilen değerin (%8.5) altında olduğu belirlenmiştir.

Beykaya ve ark. (2017) Sivas'ta süt işletmelerine gelen çiğ sütlerin kurumadde ve yağsız kurumadde miktarlarının sırasıyla en düşük %10.00 ve %7.33, en yüksek % 15.40 ve % 9.80 ve ortalama %12.73 ve %8.40 olduğunu belirlemişlerdir. Göncü ve ark. (2017) Şanlıurfa'da satışa sunulan sokak sütlerinin ortalama kurumadde ve yağsız kurumadde miktarlarının sırasıyla kış mevsiminde %11.51 ve % 8.49 ile yaz mevsiminde % 10.54 ve %8.30 olduğunu saptamışlardır. Mardin'de satışa sunulan çiğ sütlerinin ortalama kurumadde miktarlarının Beykaya ve ark. (2017) bulduğu değere benzer, Göncü ark. (2017) bulduğu değerden yüksek olduğu; örneklerin ortalama yağsız kurumadde miktarının ise her iki araştırmacının bulduğu değerden yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Yağ miktarı:** Sütün değerli besin maddelerinden olan süt yağının sütteki miktarı hayvanın irkına ve yediği yemin kimyasal bileşimine göre değişebilmektedir (Metin, 1998). Süt yağının serumda gevşek bir yapıda olması ve özgül ağırlığının süttün diğer bileşenlerinden daha düşük olması süt yağının süttün çekilmesini kolaylaştırmakta ve sütte su katılması yağ miktarının azalmasına neden olmaktadır (Sezgin ve ark., 1993). Mardin'de satışa sunulan çiğ sütlerinin yağ miktarlarının %2.00 ile %4.50 arasında ve ortalama yağ miktarını ise %3.57 olduğu, örneklerin 11 tanesinin tebliğde belirtilen değere uygun olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda çiğ sütlerinin yağ içerikleri incelendiğinde çalışmamızda belirlenen ortalama yağ miktarının Toruk (2006)'un çalışmasında bulduğu değerden (%3.17) yüksek, Kesenkaş ve Akbulut (2010) (%3.79), Kaşıkçı (2012) (% 5.68) ve Diler ve Baran (2017)'in (%3.60) çalışmalarında buldukları değerlerden düşük olduğu belirlenmiştir.

**Protein miktarı:**Sütteki protein oranının üzerinde hayvanın beslenmesi, ırkı, laktasyon dönemi ve süt verim düzeyi gibi etmenlerin etkisi bulunmaktadır (Şekerden ve Özkütük, 1995; Yalçın, 1981). Mardin’de satışa sunulan çiğ sütlerinin protein miktarının %2.41 ile %3.66 arasında değiştiği, ortalama değer %3.07 olduğu ve 9 adet çiğ süt örneğinin protein miktarının tebliğde belirtilen %2.8 değerinin altında olduğu tespit edilmiştir. Kesenkaş ve Akbulut (2010) İzmir’de satılan sokak sütleri ile çiftlik sütlerinin maksimum, minimum ve ortalama protein miktarını sırasıyla %3.74, 2.67 ve 3.31 ile %3.48, 2.65 ve 3.12 olduğunu belirlemişlerdir. Benzer çalışmalarda çiğ süt örneklerinin ortalama protein miktarının %2.98 (Türkoğlu ve ark., 2003), %3.06 (Önal, 2005) ve %3.11 (Diler ve Baran, 2014) olduğu bildirilmiştir.

**Kül miktarı:**Çeşitli makro ve iz elementleri bünyesinde bulunduran süt, özellikle Ca ve P bakımından iyi bir besin kaynağıdır Normal sütte kül miktarı yaklaşık % 0.7 civarındadır (Kurt ve ark., 1981). Mardin’de satışa sunulan çiğ sütlerin kül miktarının %0.61 ile %0.83 arasında, ortalama değer %0.72 olduğu belirlenmiştir. Türkoğlu ve ark. (2003) çalışmasında incelenen sokak sütlerinin kül miktarlarının %0.42-0.77 arasında değiştiğini, ortalama değer %0.67 olduğunu bildirmişlerdir. Diler ve Baran (2014) Erzurum’da küçük ölçekli işletmelerin süt tanklarından alınan çiğ süt örneklerinin kül miktarını ortalama %0.78 olarak saptamışlardır.

**Toplam aerob mezofilik bakteri sayısı:** İnsan sağlığı için yararlı bir besin kaynağı olan süt sağlıklı memede hijyenik olarak üretilse de sağımın ve depolama işleminin hijyenik olmayan ortamda yapılması süttün mikrobiyolojik yükünün artmasına ve teknolojik açıdan kullanılamaz hale gelmesine neden olabilmektedir. Süt kompleks biyokimyasal yapısı ve yüksek su kapasitesi nedeniyle, mezofilik ve aerob ortamda gelişen çeşitli saprofit ve patojen mikroorganizmalar için uygun besin ortamı oluşturmaktadır.

Mardin’de satışa sunulan süt toplam aerob mezofilik bakteri sayısı (TAMB) incelendiğinde en düşük, en yüksek ve ortalama sayıların sırasıyla 4.30 log kob ml<sup>-1</sup>, 8.66 log kob ml<sup>-1</sup> ve 6.62 log kob ml<sup>-1</sup> olduğu saptanmıştır. İlgili tebliğde çiğ inek süttünün toplam canlı bakteri sayısının 30°C’de 5.00 log kob ml<sup>-1</sup>’den daha düşük olması gerektiği bildirilmiştir. Çalışmada incelenen çiğ süt örneklerinin 37 tanesinin bu değere uygun olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda sokak sütlerinde belirlenen TAMB sayısı diğer araştırmacılar tarafından bildirilen 8.50 log kob ml<sup>-1</sup> (Şekerden ve Özkütük, 1995), 7.38 log kob ml<sup>-1</sup> (Dede, 2000) ve 7.17 log kob ml<sup>-1</sup> (Beykaya ve ark., 2017) değerlerinden düşük, 5.29 log kob ml<sup>-1</sup>

(Diler ve Baran, 2014) değerden yüksek bulunmuştur.

**Koliform bakteri sayısı:** *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan koliform grup bakterilerin gıdalarda bulunması; kötü sanitasyon koşullarının, yetersiz veya yanlış pastörizasyon uygulamalarının, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşma olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Çalışmada incelenen sokak sütlerindeki koliform bakteri sayısının 2.00 log kob ml<sup>-1</sup> ile 6.75 log kob ml<sup>-1</sup> arasında ve ortalama 4.98 log kob ml<sup>-1</sup> olduğu saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda çiğ süt örneklerinde ortalama koliform bakteri sayısı Atasoy ve ark. (2003) tarafından 3.83 log kob ml<sup>-1</sup>, Kesenkaş ve Akbulut (2010) tarafından 3.70 log kob ml<sup>-1</sup> olarak bildirilmiştir. Mardin’de satışa sunulan çiğ süt örneklerindeki koliform bakteri sayısının Kesenkaş ve Akbulut (2010) ile Atasoy ve ark. (2003) belirlediği değerlerden yüksek olduğu saptanmıştır.

**Maya-Küf sayısı:** Mardin’de satışa sunulan sokak sütlerinde maya-küf sayısının 3.00 log kob ml<sup>-1</sup> ile 7.65 log kob ml<sup>-1</sup> arasında ve ortalama değer 4.87 log kob ml<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda çiğ sütlerde ortalama maya-küf sayısı 3.33 log kob ml<sup>-1</sup> (Kesenkaş ve Akbulut, 2010) ve 5.57 log kob ml<sup>-1</sup> (Beykaya ve ark., 2017) olarak saptanmıştır. Analiz sonucu Mardin’den çiğ süt örneklerinin ortalama maya-küf sayısının Kesenkaş ve Akbulut (2010)’un buldukları değerden yüksek, Beykaya ve ark. (2017)’in buldukları değerden düşük olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde süt endüstrisindeki gelişmelere bağlı olarak süt kalitesi ile hijyen kurallarına olan dikkatin artmasına rağmen tüketicilerin bir kısmının yerel perakendecilerde satılan çiğ süttün daha saf, taze ve doğal olduğunu düşünmesi, fiyatının daha düşük olması ve tüketiciye kolaylıkla ulaşılabilir olması çiğ süt satışının yaygın olmasına neden olmaktadır. Mardin’de farklı satış noktalarından toplanan 40 adet çiğ süt örneğinin gerek fizikokimyasal ve gerekse mikrobiyolojik özellikler açısından 38 tanesinin (yani %95’inin) Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ’de belirtilen değerlere uygun olmadığı saptanmıştır. %22.50’sinin titrasyon asitliği, %5’inin yoğunluk, %10’nun yağsız kurumadde, % 27.50’sinin yağ, %22.50’sinin protein ve % 92.50’sinin toplam canlı bakteri sayısının Türk Gıda Kodeksi Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ’de belirtilen değerlere uygun olmadığı belirlenmiştir. Örneklerin pH ve kurumadde değerleri diğer araştırmacıların sonuçları ile benzer bulunurken, kül, koliform bakteri sayısı ve maya-küf sayısı değerleri değişkenlik göstermiştir.

Çalışmada elde edilen veriler genel olarak benzerlik göstermektedir. Ancak özellikle örneklerdeki TAMB sayısının ve asitlik değerlerinin

yüksek oluşu sütlerin hijyenik olmayan koşullarda depolandığının altını çizmektedir. Bu sonuçlar ışığında Mardin'de perakendeciler tarafından satışı sunulan çiğ sütlerin fizikokimyasal ve mikrobiyal kalitelerinin iyi olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle perakendeciler tarafından satışı sunulan çiğ sütlere ait kontrollerin artırılarak halk sağlığı açısından risk oluşturması engellenmesi gerekmektedir.

## Kaynaklar

- Akın MS, Yapık Ö, Akın MB, 2016: Adıyaman ilinde süt üretim çiftliklerinden ve toplayıcılardan sağlanan sütlerin bazı özellikleri. *Harran Tar ve Gıda Bil Derg* 20(4), 253-265.
- Anonim, 1989: Çiğ Süt Standardı. TS1018. Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, 2016: Ulusal Süt Konseyi. <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/kategori/raporlar/sut-konseyi-raporlari/>. Erişim tarihi; 26/03/2019.
- Anonim, 2017: Çiğ sütün arzına dair tebliğ (No: 2017/20) 27 Nisan 2017 tarihli Resmi Gazete, Sayı: 30050.
- Atasoy F, Türkoğlu H, Özer B, 2003: Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışı sunulan süt, yoğurt ve urfa peynirlerinin bazı mikrobiyolojik özellikleri. *Harran Üni Ziraat Fak. Derg*, 7(3-4), 77-83.
- Aydın S, Çetinkaya A, Bayrakçı E, 2010: Kars ilinde üretilen inek sütlerinin bazı kimyasal özellikleri. İçinde: Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu, Düzcce, 1-7.
- Beykaya M, Özbey A, Yıldırım Z, 2017: Sivas ilindeki bazı süt işletmelerine gelen sütlerin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Türk Tarım Gıda Bil ve Tek Derg* 5(4), 388-396.
- Dede C, 2000: İstanbul'da satılan sokak sütlerinin mikrobiyolojik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kocaeli.
- Demirci M, Öksüz Ö, Şimşek O, Kurultay Ş, Kıvanç M, Gündüz HH, Uçan N, 2010: Süt ve Süt Ürünlerinin Kalite Kontrolü. Eskişehir. Türkiye.
- Diler A, Baran A, 2014: Erzurum'un Hınıs ilçesi çevresindeki küçük ölçekli işletme tank sütlerinden alınan çiğ süt örneklerinin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Alinteri*, 26 (B), 18-24.
- Fox PF, McWeeney PLH, 2003: In Chapter 1: Milk Proteins: General and Historical Aspects. In: *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 (Third Edition Part A)*. New York, USA.
- Göncü B, Çelikel A, Akın MB, Akın MS, 2017: Şanlıurfa'da satışı sunulan sokak sütlerinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Harran Üni Müh Derg* 2(2), 15-23.
- IDF, 1982: Determination of the total solid content (cheese and processed cheese). IDF Standard: 4A.Brussels: International Dairy Federation.
- Kaşıkçı M, 2012: Sivas ili Yıldızeli ilçesinde halk elinde yetiştirilen esmer sığırların çiğ süt kompozisyonu ve somatik hücre sayısının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Tokat.
- Kesenkaş H, Akbulut N, 2010: İzmir ilinde satılan sokak sütleri ile orta ve büyük ölçekli çiftliklerde üretilen sütlerin özelliklerinin belirlenmesi. *Ege Üni Ziraat Fak Derg*, 47(2): 161-169.
- Köşker Ö, Tunail N, 1985: Süt ve Mamulleri Mikrobiyolojisi ve Hijyeni Uygulama Klavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 985, Uygulama Klavuzu No: 217, Ankara.
- Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A, 1993: Süt ve Mamulleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi. Erzurum, Türkiye.
- Kurt A, Demirci M, Kurdal E, 1981: Erzurum piyasasında satılan sütlerin, özellikleri ve bu sütlerin çeşitli hile yöntemlerinin incelenmesi. *Gıda*, 6(8), 15-19.
- Majjala K, 2000: Cow milk and human development and well-being. *Livest Prod Sci* 65, 1-18.
- Metin M, 1998: Süt Teknolojisi. Bornova, İzmir.
- Metin M, 2005: Süt teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi., İzmir.
- Metin M, 2010: Süt ve Mamulleri Analiz Yöntemleri (Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Analizleri), Bornova, İzmir.
- Miller GD, Jarvis KJ, McBean LD, 2000: The importance of milk and milk products in the diet. In "Handbook of Dairy Foods and Nutrition", Ed; J. Kroger, NY, USA.
- Oysun G, 2011: Süt ve Ürünlerinde Analiz Yöntemleri. Bornova, İzmir.
- Önal AR, 2005: Trakya'da özel bir süt işleme tesisi tarafından değerlendirilen çiğ sütlerin somatik hücre sayısı ve bazı bileşenlerin tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Özrenk E, Bayar N, 2008: Konya yöresine ait sütlerin bazı kalite özellikleri. İçinde: Türkiye 10. Gıda Kongresi. Erzurum. 695-700 ss.
- Sezgin E, Atamer M, Koçak C, Yıldırım M, Yıldırım Z, 1993: Ankara'da satılan sokak sütlerinin bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 1331.
- Şekerden Ö, Özkütük K, 1995: Büyük Baş Hayvan Yetiştirme. Adana, Türkiye.
- Tekinşen C, 1996: Süt Ürünleri Teknolojisi. Konya, Türkiye.
- Tokur E, 2006: Ankara'da satılan sokak sütlerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Türkoğlu H, Atasoy F, Özer B, 2003: Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışı sunulan süt yoğurt ve urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri. *Harran Üni Ziraat Fak. Derg.*, 7(3-4), 69-76.
- TÜİK, 2018: TÜİK, <https://biruni.tuik.gov.tr/bolgesel-statistik/degiskenlerUzerindenSorgula.do> Erişim tarihi: 26-03-2019.
- Yalçın BC, 1981: Genel Zootekni. İstanbul, Türkiye

**\*Yazışma Adresi:** Aslı ÇELİKEL GÜNGÖR

Mardin Artuklu Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Mardin, Türkiye  
e-mail: acelikel2@gmail.com

## A New Primer Designing for PCR-RFLP Analysis of A and B Genetic Variants of Bovine Kappa-Casein

Mevlüt ARSLAN<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yüzüncü Yıl University, 65080, Van, Turkey.  
ORCID: 0000-0003-4883-4736

Tarihi: 28.11.2019

Kabul Tarihi: 23.06.2020

**Abstract:** Bovine milk contains about 3.4% high-quality protein and it is very essential for human nutrition. Kappa ( $\kappa$ ) casein is one of the milk proteins and encoded by the *CSN3* gene. Studies have shown that  $\kappa$ -casein has an important influence on milk properties and the manufacturing of milk.  $\kappa$ -casein takes role as a stabilizing factor during the curdling of milk, which makes it desired in the cheese factory. A and B genetic variants of  $\kappa$ -casein are well-known and well-studied. For the genotyping of bovines, the PCR-RFLP approach has been used. For this aim, different primer pairs have been used to amplify the polymorphic region of the *CSN3* gene. In a previous study, the *HinfI* enzyme digestion of the polymorphic region resulted in short and similar length fragments. In agarose gel electrophoresis, separation of very similar DNA fragments is almost impossible and interpretation of the short DNA fragment sometimes causes challenges. Therefore, in this study, a new primer design was described. Using the new primer, longer DNA fragment was amplified successfully and *HinfI* digestion of the PCR product let to a longer and very different lengths of DNA fragments, which can be easily separated and interpreted in agarose gel electrophoresis. The primer described in this study can be used in further studies related to allele frequency researches and breeding strategies.

**Keywords:** Milk,  $\kappa$ -casein, *CSN3*, Polymorphism, PCR-RFLP, Primer design.

### Sığır Kappa-Kazeinin A ve B Genetik Varyantlarının PCR-RFLP Analizi için Yeni Bir Primer Dizaynı

**Özet:** İnek sütü yaklaşık %3,4 oranında yüksek kaliteli protein içerir ve insan beslenmesi için oldukça elzemdir. Kappa ( $\kappa$ ) kazein, süt proteinlerinden birisidir ve *CSN3* geni tarafından kodlanmaktadır. Çalışmalar  $\kappa$ -kazeinin sütün özellikleri ve işlenmesi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.  $\kappa$ -kazein sütün kesilmesi sürecinde stabilize edici bir faktör olarak rol almaktadır; bu durum,  $\kappa$ -kazeini peynir fabrikalarında istenilir hale getirmektedir. Kappa ( $\kappa$ ) kazeinin A ve B genetik varyantları iyi bilinmekte ve yoğun çalışılmaktadır. Sığırların genotiplenmesi için PCR-RFLP yöntemi kullanılmaktadır. Bu amaçla, farklı primer çiftleri *CSN3* geninin polimorfik bölgesini çoğaltmak için kullanılmaktadır. Önceki bir çalışmada, polimorfik bölgenin *HinfI* enzimi ile kesimi kısa ve benzer uzunlukta fragmentler oluşturdu. Agaroz jel elektroforezinde çok benzer DNA fragmentlerinin ayrımı neredeyse imkansızdır ve kısa DNA fragmentlerin yorumlanması bazen zorluklara sebep olmaktadır. Bu sebeple, bu çalışmada yeni bir primerin dizaynı tanımlandı. Yeni primerin kullanılmasıyla daha uzun DNA fragmenti başarılı bir şekilde çoğaltıldı ve bu PCR ürünlerinin *HinfI* kesimi, agaroz jel elektroforezinde kolaylıkla ayrılabilen ve yorumlanabilen çok farklı uzunlukta DNA fragmentlerinin oluşmasını sağladı. Bu çalışmada tanımlanan primer, allel frekans araştırmaları ve yetiştirme stratejileri ile ilgili gelecek çalışmalarda kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Süt,  $\kappa$ -kazein, *CSN3*, Polimorfizm, PCR-RFLP, Primer dizaynı.

## Introduction

Bovine milk contains approximately 87% water and 13% dry matter including 4.6% lactose, 3.4% protein, 4.2% fat, 0.8% minerals and 0.1% vitamins and its composition can be affected by different factors such as breeding, feeding strategies, lactation stage and season (Lindmark-Månsson et al., 2003; Månsson, 2008). Approximately 80% of the milk proteins is consisted of casein proteins and the remaining part (~20%) is composed of whey proteins or serum proteins ( $\beta$ -lactoglobulins and of  $\alpha$ -lactalbumin) (Eigel et al., 1984; Otaviano et al., 2005). Casein proteins are subdivided into four groups:  $\alpha$ S1-casein,  $\alpha$ S2-casein,  $\beta$ -casein, and  $\kappa$ -casein (Eigel et al., 1984).  $\kappa$ -casein protein comprises about 12% of the casein proteins.  $\kappa$ -casein gene (*CSN3*) has five exons and most of

mature  $\kappa$ -casein protein is encoded by the fourth exon which indicates the importance of the fourth exon on  $\kappa$ -casein polymorphisms (Azevedo et al., 2008).

It has been reported that  $\kappa$ -casein is highly homologous to the  $\gamma$  chain of fibrinogen, which serves a similar function of the fibrinogen (Azevedo et al., 2008). Therefore,  $\kappa$ -casein plays a crucial role in the coagulation and curdling of milk in where it serves as a stabilizing factor (Fiat and Jolles, 1989). Until now, twelve genetic variants (A, A', B, C, D, E, F<sup>1</sup>, F<sup>2</sup>, G<sup>1</sup>, H, I and J) of  $\kappa$ -casein have been identified in *Bos taurus* (Caroli et al., 2009), but the most frequent alleles are the A and B alleles (Farrell et al., 2004; Prinzenberg et al., 1999). In the variant A, threonine takes place at 136 of position on the

amino acid chain of  $\kappa$ -casein, and aspartic acid exists at 148 position on the chain. In the variant B, threonine is replaced with isoleucine and aspartic acid is replaced by alanine at the described positions of  $\kappa$ -casein (Alexander et al., 1988).

Studies have shown that milk yield and its composition, cheese yield and its quality are associated with  $\kappa$ -casein. Therefore,  $\kappa$ -casein is determined as a genetic marker and quantitative trait loci (Caroli et al., 2009; Comin et al., 2008). Furthermore Also, previous studies have shown that genetic variants of  $\kappa$ -casein have an impact on the manufacturing of milk and milk protein yield, protein content and, milk yield (McLean et al., 1984; Rachagani and Gupta, 2008; Tsiaras et al., 2005). B variant of  $\kappa$ -casein has been associated with shorter coagulation time and better curdles in cheese making (Aleandri et al., 1990; Marziali and Ng-Kwai-Hang, 1986). Marziali and Ng-Kwai-Hang (1986) have reported that the cheese yield from cows with genotype BB is 10% higher compared to cows with genotype AA. All these findings have led to  $\kappa$ -casein and its variant as a candidate for breeding strategies. For identification of A and B variant of *CSN3*, PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) approaches have been used. Patel et al. (2007) described a PCR-RFLP method for A and B variant of  $\kappa$ -casein. Patel et al. (2007) amplified 350 bp region of  $\kappa$ -casein by PCR, in which *HinfI* restriction enzyme digestion of the PCR product resulted in short and very close length of DNA fragments: 84, 134 and 132 bp (Patel et al., 2007). Separation of 134 and 132 bp fragments in agarose gel electrophoresis is almost not possible and short fragments sometimes problematic. Therefore, the aim of the study was to improve the method by designing a more advantageous primer. Using the new primer, longer DNA region of  $\kappa$ -casein was amplified and restriction digestion of the amplified region resulted in more different DNA fragments, which are easily separated and interpreted in the agarose gel electrophoresis system.

## Materials and Methods

**DNA extraction:** This study was approved by the Animal Researchers Local Ethics Committee of Van Yüzüncü Yıl University, Turkey (approval 07.03.2019-2019/2). Blood samples (2 ml) from fifteen cattle (Brown swiss) were collected in an anti-coagulant tube containing EDTA and stored at -20°C until DNA isolation. DNA isolation was carried out using the WizPrep™ gDNA Mini Kit (Wizbio, Republic of Korea) following the manufacturer's protocol with some modification. Briefly, frozen

blood samples were thawed in room temperature and 200  $\mu$ l whole blood was added to the microcentrifuge tube. Then, the tubes were centrifuged at 10.000 g for 1 min and supernatants were discarded, and pellets were washed twice by nuclease-free water. The following steps were performed as described in the protocol. DNA concentrations were measured spectrophotometrically.

**Primer design:** DNA sequence of *CSN3* was downloaded from the GenBank (No: AY380228) and focused on the fourth exon of *CSN3* (Figure 1). To obtain easily separable restriction fragments in agarose gel electrophoresis, 25 bp sequence was randomly selected, which is 100 bp upstream region of the previously described forward primer by Patel et al. (2007).

```
CCATAGATGGCAGCCACTAGGCTCCCCAGTCCCTGGGATCTCCAGGCAAGAAATAATACCATTCTGCA
TAATTTATTTTTTACACCGCTGTGAGAAAGTGAAGATCTTTCAGTGCACAAATAGCCAAATATATCC
CAATTCAGTATGTCTGAGTAGGTATCTAGTGTATGSACTCAATTAACACACAGAAACAGTGTGACT
AATTAATAATCAATTTCTGCATACCCATATATGCAAGCCAGCTGCAGTATAGTCCACTGGCCAAAT
CTTCAATGGCAGGTTTGTCAATACTGTGCTGCAAGTCTGCCAAGCCAGCCACTACCAATGGCCAC
GTCCACCACACCCCAATTTATCAATTTATGGCCATTCACCAAGAAATAATAGGATATAACAGAAATCCC
TACCATCAATACCCATTGCTAGTGTGAGCCCTACCAAGTACACCTACCAAGCAGGATAGAGAGCACTGTA
GCTACTCTAGAGATTCTCCAGAAATTATGAGAGCCCACTGAGATCAACACAGTCCAGATTAATCAAT
CTCAGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAGAAAGACACAGCCAGGTAATAAGCAAAATGAATACAGC
CAAGATTCAATGACTTATTAATAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGAATTAATCTGTTT
CAGAGAGGCGAAATGGGCTAATTAATCACTTACATTTGCTGTTCTTTATCATGATATACTAGATTCTT
TCCCACAGAAAGTTTTAAATATTTTACAAATGAGTAAATTCAGATTTTATTAATAACCTTTT
```

**Figure 1.** DNA region of the interest of *CSN3*. Gray highlight shows the region of the fourth exon of *CSN3*. Yellow highlights show binding sites of the previously described primers by Patel et al. (2007). Green highlight shows binding site of the new primer.

The selected sequence was analyzed by Primer-Blast (Ye et al., 2012) and the OligoAnalyzer (Owczarzy et al., 2008) tools for primer specify and property to determine whether the primer is useful for PCR amplification or not. For the calculations in OligoAnalyzer tool, default values were considered. To check any existing cutting site on the interested 100 bp upstream DNA region, the online restriction digest tool RestrictionMapper (version 3) (<http://www.restrictio.nmapper.org/>) was used.

**PCR:** The polymorphic region of the *CSN3* gene was amplified by using forward (called Primer 1) 5'-ATCATTATGGCCATCCACCAAAG-3' and reverse 5'-GCCCATTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3' (called Primer 2) primer pair, which amplifies 350 bp region described by Patel et al. (2007). Also, the polymorphic region was amplified by the newly designed forward primer (called Primer 3) 5'-CTGCCAAATTCTTCAATGGCAAGT-3' and Primer 2 to amplify 450 bp region of DNA. PCR amplification was carried out using 2xTaq Master Mix (Vivantis, Malaysia) in the presence of ~100 ng template DNA and 0.2  $\mu$ M (final concentration) of each primer. PCR condition for Primer 1 and Primer 2 was included: an initial denaturation step at 94°C for 2 min. and 30 sec., followed by 35 cycles of 94°C for 20 sec. for denaturation, 55°C for 1 min. for

annealing, 72°C for 40 sec. for extension, and a final extension at 72°C for 5 min. The second PCR condition for Primer 3 and Primer 2 was the same with the first condition except for annealing condition which was 60°C for 40 sec. PCR products were run in 2% agarose gel containing fluorescent dye (Euroclone, Italy) at 90 volts (V) for 70 min. After electrophoresis, the gel was visualized under ultraviolet (UV) light and recorded.

**Restriction of PCR product:** The amplified (both 350 and 450 bp) PCR products (about 20 µl) were digested overnight by the *HinfI* restriction enzyme (Fermentas) in a water bath at 37°C. After the overnight digestion, digested products were separated in 2% agarose gel containing fluorescent dye (Euroclone, Italy) at 90 V for 70 min and visualized under UV light.

## Results

### 450 bp digest

Enzymes: *HinfI*

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
234	none	1	<i>HinfI</i>	234	CTGCCCAAAT TCTTCAATGG CAAGTTTTGT CAAATACTGT GCCTGCCAAG TCTGCCAAG CCCAGCCAAC TACCATGGCA CGTCACCCAC ACCCACATTT ATCATTATG GCCATTCCAC CAAAGAAAAA TCAGGATAAA ACAGAAATCC CTACCATCAA TACCATTGCT AGTGGTGAGC CTACAAGTAC ACCTACCACC GAAGCAGTAG AGAGCACTGT AGCTACTCTA GAAG
131	<i>HinfI</i>	235	<i>HinfI</i>	365	ATTCTCCAGA AGTTATTGAG AGCCACCTG AGATCAACAC AGTCCAAGTT ACTTCAACTG CAGTCTAAAA ACTCTAAGGA GACATCAAAG AAGACAACGG AGGTAAATAA GCAAAATGAA TAACAGCCAA G
85	<i>HinfI</i>	366	none	450	ATTCATGGAC TTATTAATAA AATCGTAACA TCTAAACTAG CGTAGATGGA TAAATTAAT CTGTTACAGA GAAGGCGAAA TGGGC

**Figure 2.** *HinfI* restriction mapping of predicted 450 bp PCR product. The sequence corresponds to A variant of *CSN3* gene (GenBank No: AY380228).

**Table 1.** In this study used primers and its properties.

Primer	Sequence (5'>3')	Length	Tm (°C)*	GC (%)	Reference
Primer 1	ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG	25	56.0	40.0	Patel et al. (2007)
Primer 2	GCCATTTCGCCTTCTGTACAGA	26	60.7	50.0	Patel et al. (2007)
Primer 3	CTGCCCAAATCTTCAATGGCAAGT	25	58.5	44.0	In this study

\*Tm values were calculated based on default setting on OligoAnalyser tool.

For secondary structure formation properties of primers, the most probable hairpin structures and its  $\Delta G$  (Gibbs free energy) and Tm value was

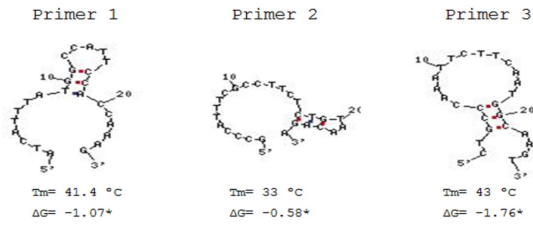
Primer specificity of the newly designed primer (Primer 3) was checked by the Primer-Blast tool (Ye et al., 2012) in this study. Results showed that Primer 3 and the previously described reverse primer (Primer 2) by Patel et al. (2007) was able to amplify the specific 450 bp region of *CSN3*, which comprises single nucleotide polymorphisms (SNPs), causing A and B variant proteins (data not shown).

The online tool RestrictionMapper (version 3) was used to show any existing restriction site of *HinfI* on the 100 bp upstream region. 450 bp DNA sequence was uploaded and then cutting site and probable restriction fragment was obtained for *HinfI in silico* (Figure 2). As shown in Figure 2, there was no existing restriction site for *HinfI*, and expected DNA fragments were 85, 131, and 234 bp, which can be easily separated in conventional agarose gel electrophoresis.

Melting temperature (Tm) and Guanin-Sitozin ratio (GC) of primers were shown in Table 1. Primer 3, has a better Tm and GC content compared to the described forward primer by Patel et al. (2007), which indicates usefulness of the Primer 3 in PCR.

determined (Figure 3). According to the results, there was no significant difference between Primer 1 and Primer 3 in the case of  $\Delta G$  and Tm values.





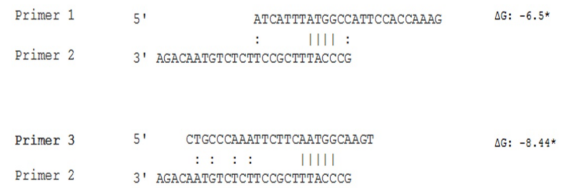
**Figure 3.** Predicted hairpin structures of primers. The most possible structures were shown. Calculations were performed by default setting. \* indicates kcal.mole<sup>-1</sup>



**Figure 4.** Self-dimer formation properties of primers. Solid line represents pairs of complementary bases and dotted lines represent additional complementary bases, which does not impact on calculated ΔG values. \* indicates kcal.mole<sup>-1</sup>.

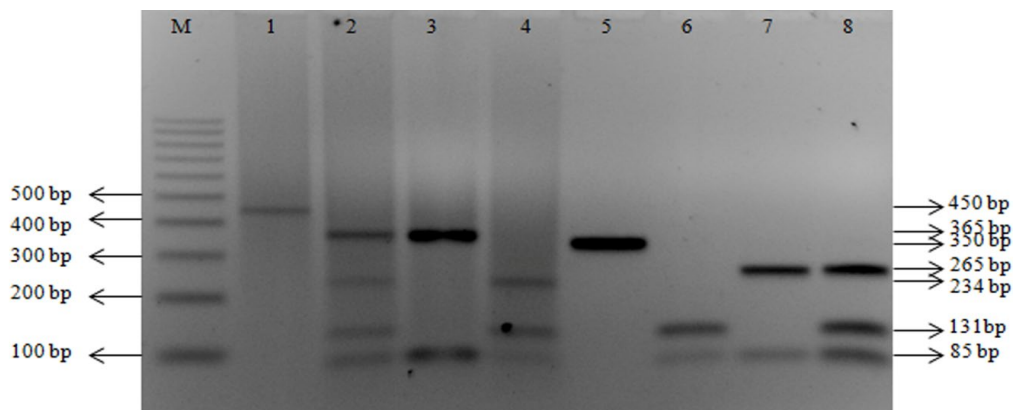
Self-dimer structure formation analysis indicates the binding of primer each self. The most probable self-dimer structures were determined for each primer (Figure 4). As shown in the figure, Primer 1 has eight complementary pairs and its ΔG value is significantly lower negative than that of Primer 3, which supports usefulness of Primer 3 and also indicates less problematic PCR experience, In the next step, hetero-dimer formation was checked

and the most probable hetero-dimer formation was determined (Figure 5). Results indicated that Primer 3 and Primer 2 pairs have a slight negative ΔG value than that of Primer 1 and Primer 2.



**Figure 5.** Hetero-dimer properties of primer pairs. Solid line represents pairs of complementary bases, and dotted lines are additional complementary bases and do not impact on calculated ΔG values. \* indicates kcal.mole<sup>-1</sup>.

After primer specificity and properties were checked, PCR amplifications of the interested region were carried out using the described primers. PCR products were run in 2% agarose gel and then PCR products were digested overnight by *Hin*I restriction enzyme. Restriction fragments were separated by agarose gel electrophoresis as described (Figure 6). As expected, Primer 2 and Primer 3 were able to amplify 450 bp region of *CSN3*, and *Hin*I restriction of the 450 bp PCR product resulted in 85, 131 and 234 bp fragments for genotype A, 365 and 85 bp for genotype B, 85, 131, 234 and 365 bp for genotype AB (Figure 6). It is clearly shown that the enzyme digested fragments were easily separated in 2% agarose gel electrophoresis.



**Figure 6.** Agarose gel electrophoresis of PCR product and its restricted fragments by *Hin*I. Line M indicates 100 bp DNA marker (MR61, Blirt, Poland). Line 1 shows PCR product, which obtained using Primer 2 and Primer 3. Line 2, line 3 and line 4 shows genotype AB, B and A, respectively, which were obtained by *Hin*I digestion of the 450 bp PCR product. Line 5 indicates 350 bp PCR product, which is obtained described primer by Patel et al. (2007). Line 6, line 7 and line 8 show genotype A, B and AB, respectively, which are obtained by *Hin*I digestion of the 350 bp PCR product.

### Discussion

In literature, to determine DNA variations, there are many different methods such as sequencing, denaturing gradient gel electrophoresis

(DGGE), single-strand conformation polymorphism (SSCP) and restricted fragment length polymorphism (RFLP) (Dong and Zhu, 2005; Fodde and Losekoot, 1994; Franca et al., 2002; Ota et al., 2007). Sequencing gives more detailed information

about of interest compared to other methods, but it is more costly and requires automated equipment. In the DGGE method, denaturing gradient gel is needed to be prepared, which are required especial material and equipment. In the SSCP method, the polyacrylamide gel electrophoresis technique is used, which is more complex compared to the agarose gel electrophoresis technique. Also, both DGGE and SSCP methods do not show a mutation type. They can only show existing mutation(s). However, the PCR-RFLP method is simpler than the other methods based on the required equipment and applications, and it may give information regarding mutation type. Thus, it has a big advantage for genotyping studies and has been used for many decades. In this study, a restriction enzyme-based detection of single nucleotide polymorphisms of *CSN3* was described, designing more advantageous primer for PCR-RFLP analysis.

PCR is used for synthesizing of a million copies of specific DNA fragments and it is one of the most widely used tools in health and life science researches (Saiki et al., 1988). Secondary structures such as self-dimers, hairpins, and heterodimers of the designed primer or primers may affect the success of PCR. Therefore, these parameters might be considered to design a primer.  $\Delta G$  is the Gibbs free energy for oligonucleotide as calculated by the nearest neighbor method (Breslauer et al., 1986; Sugimoto et al., 1996).  $\Delta G$  indicates energy to disrupt the duplex formed oligonucleotide and determines the stability of the DNA molecule (Breslauer et al., 1986; Stephenson, 2003). It is considered that  $\Delta G$  value of primer(s) should be weaker or higher value than -9.0 kcal/mole for acceptable secondary structure(s).  $\Delta G$  value with higher value than -9.0 kcal/mole indicates the quality of primer, in where quality is the ability to efficiently amplify the desired template (Mann et al., 2009). Primer 3 has acceptable  $\Delta G$  values, which indicates that it is an appropriate candidate for amplification of the region of interest (Figure 4 and Figure 5).

DNA melting is the process in which a double-stranded helix DNA is separated into two single strands DNA by denaturants (Rouzina and Bloomfield, 1999).  $T_m$  of double-stranded DNA or oligonucleotide is that half of the molecule is double-stranded conformation and half is single-stranded form in the defined temperature (Stephenson, 2003). Melting temperatures of two primers should be similar for an optimal PCR reaction (Stephenson, 2003). It is considered that  $T_m$  difference between primers should be lower than 5. As shown in Table 1.  $T_m$  value of Primer 3 and Primer 2 was very close to each other, which indicates usefulness of the primer pair.  $T_m$  value is

affected by presence of potassium ( $K^+$ ) and magnesium ( $Mg^{++}$ ) ions. Therefore, for better calculation of  $T_m$ , the salt presence should be considered (Stephenson, 2003).

*HinfI* was isolated from the *Haemophilus influenzae* type I. The restriction site of *HinfI* is 'G/ANTC' in where N might be a A, C, G or T bases (Smith and Wilcox, 1970). As shown in Figure 2 and 6, Allele A has two *HinfI* restriction site, which is 'G/ATTC' at 234 and 365 bp on the region of interest and its restriction results in 85, 131, and 234 bp fragments. However, the 350 bp amplicon obtained by described primers by Patel et al. (2007) results in 84, 132, and 134 for A variant. As shown in Figure 6, only two fragments were shown due to the close length fragment issue. In this study, using the new forward primer let to a more practical evaluation of the genotypes since longer and more different fragments are advantageous due to better band intensity, requiring lower percentage agarose or/and running time.

In conclusion, the described primer in this study results in easily separable and longer restriction fragments, which leads to a more easy and practical evaluation of the genotypes in conventional agarose gel electrophoresis. It can be easily used for allele frequency research of *CSN3* and also for breeding strategies considering A and B variant of *CSN3*.

### Acknowledgment

The author thanks Asst. Prof. Adnan AYAN for his laboratory help and supports.

### References

- Aleandri R, Buttazzoni LG, Schneider JC, Caroli A, Davoli R, 1990: The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. *J Dairy Sci.*, 73, 241-255.
- Alexander LJ, Stewart AF, Mackinlay AG, Kapelinskaya TV, Tkach TM, Gorodetsky SI, 1988: Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur J Biochem*, 178, 395-401.
- Azevedo AL, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MR, Peixoto MG, Teodoro RL, Verneque RS, Guimaraes SE, Machado MA, 2008: Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genet Mol Res*, 7, 623-30.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA, 1986: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 3746-50.
- Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ, 2009: Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci*, 92, 5335-52.
- Comin A, Cassandro M, Chessa S, Ojala M, Dal Zotto R, De Marchi M, Carnier P, Gallo L, Pagnacco G, Bittante G,

- 2008: Effects of composite beta- and kappa-casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows. *J Dairy Sci*, 91, 4022-7.
- Dong Y, Zhu H, 2005: Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med*, 108, 149-57.
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell HM, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney RM, 1984: Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision1. *J Dairy Sci*, 67, 1599-1631.
- Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE, 2004: Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci*, 87, 1641-74.
- Fiat AM, Jolles P, 1989: Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Mol Cell Biochem*, 87, 5-30.
- Fodde R, Losekoot M, 1994: Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat*, 3, 83-94.
- Franca LT, Carrilho E, Kist TB, 2002: A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys*, 35, 169-200.
- Lindmark-Månsson H, Fondén R, Pettersson H-E, 2003: Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J*, 13, 409-425.
- Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Noble WS, 2009: A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic Acids Res*, 37, e95-e95.
- Månsson HL, 2008: Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*, 52, 10.3402/fnr.v52i0.1821.
- Marziali AS, Ng-Kwai-Hang KF, 1986: Effects of Milk Composition and Genetic Polymorphism on Cheese Composition: Minutes of the Executive Committee Meetings and Summary Reports of ADSA Committees and Representatives. *J Dairy Sci*, 69, 2533-2542.
- McClean DM, Graham ER, Ponzoni RW, McKenzie HA, 1984: Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J Dairy Res*, 51, 531-46.
- Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H, 2007: Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc*, 2, 2857-64.
- Otaviano AR, Tonhati H, Sena JaD, Cerón Muñoz MF, 2005: Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Genet Mol Biol*, 28, 237-241.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, Mcquisten KA, Almabrazi HG, Pedersen KF, Lin Y, Garrettson J, Mcentaggart NO, Sailor CA, Dawson RB, Peek AS, 2008: IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res*, 36, W163-W169.
- Patel RK, Chauhan BJ, Singh MK, Soni KJ, 2007: Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (*Bos taurus*×*Bos indicus*) Dairy Bulls. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 399-402.
- Prinzenberg EM, Krause I, Erhardt G, 1999: SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). *Anim Biotechnol*, 10, 49-62.
- Rachagani S, Gupta ID, 2008: Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. *Genet Mol Biol*, 31, 893-897.
- Rouzina I, Bloomfield VA, 1999: Heat capacity effects on the melting of DNA. 1. General aspects. *Biophys J*, 77, 3242-3251.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- Smith HO, Wilcox KW, 1970: A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol*, 51, 379-91.
- Stephenson F, 2003: The Polymerase Chain Reaction. In "Calculations for Molecular Biology and Biotechnology", Ed; Stephenson F, Academic Press, Burlington.
- Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M, Honda K, 1996: Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, 24, 4501-4505.
- Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscós CM, 2005: Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *J Dairy Sci*, 88, 327-34.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL, 2012: Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- \*Correspondence address:** Mevlüt ARSLAN  
Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine,  
Van Yüzüncü Yıl University, 65080, Van, Turkey.  
**\*e-mail:** mevlutarслан@yyu.edu.tr

## Sütçü İneklerde Subklinik Mastitislerde Meme İçi Ozon Tedavisinin İyileştirici Etkisi

İbrahim DOLĞUN<sup>1,a</sup>, Mustafa Kemal SARIBAY<sup>2,b\*</sup>, Erhan Tek<sup>3,c</sup>

<sup>a</sup>ORCID:0000-0001-9073-745X, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-9903-4942, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-4595-6992

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye

<sup>2</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

<sup>3</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi: 28.11.2019

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Özet:** Çalışmada subklinik mastitis teşhisi konulan ineklerde ozon gazı tedavisinin iyileştirici etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini laktasyondaki 20 baş ineğe ait 24 adet subklinik mastitisli meme lobu oluşturdu. Subklinik mastitisli hayvanların tespiti amacıyla, her ineğin dört meme lobundan ayrı ayrı alınan süt örneklerine CMT uygulandı ve CMT pozitif reaksiyon veren ineklerden bakteriyolojik muayene amacıyla numune alındı. İnekler iki gruba ayrıldı, ilk gruba (Grup I, n=10) 3 gün süresince ve 24 saat ara ile antimastit preparatı (Tetra delta LC®, Pfizer) meme içi yolla uygulandı. İkinci gruba (Grup II, n=10) ozon jeneratöründen (Genozon®) 6 mg/lt ozon hesabıyla, 1-5 lt arası ozon/oksijen gazı, 1 lt/dk hesabıyla 3 gün uygulandı. Grup I'de süt örneklerinde üreyen bakterilerin 9 adet Koagülaz Negatif *Staphylococcus* spp. (KNS) (%75), 2 adet *Staphylococcus aureus* (%16.67) ve 1 adet KNS + *Staphylococcus aureus* (%8.33) olduğu görüldü. Tedavi sonrası bakteriyolojik iyileşme oranları sırasıyla %77.77 (7/9), %50 (1/2) ve %100 (1/1) olarak saptandı. Grup II'de süt örneklerinde üreyen bakteriler, 5 adet (%41.66) KNS, 2 adet *Staphylococcus aureus* (%16.67), 2 adet (%16.67) *Streptococcus* spp. ve 3 adet KNS+*Streptococcus* spp. olarak tespit edildi. Bakteriyolojik iyileşme oranları sırasıyla %100 (5/5), %100 (2/2), %0 (0/2) ve %0 (0/3) olarak saptandı. Grup I ve Grup II'nin toplamda bakteriyolojik iyileşme oranları ise sırasıyla %75 (9/12), %58.33 (7/12) olarak belirlendi. Sonuç olarak, meme içi ozon gazı uygulamasının KNS ve *Staphylococcus aureus*'dan kaynaklanan subklinik mastitislerin tedavisinde oldukça etkin olduğu ve antibiyotiklere alternatif olabileceği, *Streptococcus* spp. kaynaklı subklinik mastitislerde ise iyileştirici etkisinin olmadığı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Subklinik mastitis, İnek, Antibiyotik, Ozon.

### The Recovery Effect of Intramammary Ozone Therapy for Subclinical Mastitis in Dairy Cows

**Abstract:** This study aimed to determine the curative effect of ozone gas treatment in cows diagnosed with subclinical mastitis. The material of the study consisted of 24 subclinical mastitis mammary lobes belonging to 20 cows in lactation. For the detection of animals with subclinical mastitis, CMT was applied to the milk samples taken from the four breast lobes of each cow, and samples were taken from the cows reacting CMT positive for bacteriological examination. The cows were divided into two groups, in the first group (group I, n = 10), for 3 days and 24 hours apart antimastitis preparation (Tetra delta LC®, Pfizer). The second group (group II, n = 10) was treated with ozone gas for 3 days which was generated from ozone generator (Genozon®) 6 mg/lt ozone, 1-5 lt ozone/oxygen gas and 1 lt/minute calculation. The isolated bacteria in group I, 9 CNS (75%) and 2 *Staphylococcus aureus* (16.67%) and 1 KNS + *Staphylococcus aureus* (8.33%). Bacteriological recovery rates after treatment were 77.77% (7/9), 50% (1/2) and 100% (1/1), respectively. The isolated bacteria in group II, 5 (41.66%) CNS and 2 *Staphylococcus aureus* (16.67%), 2 (16.67%) *Streptococcus* spp. and 3 KNS + *Streptococcus* spp. Bacteriological recovery rates were 100% (5/5), 100% (2/2), 0% (0/2) and 0% (0/3) respectively. Bacteriological recovery rates of group I and II were 75% (9/12) and 58.33% (7/12), respectively. As a result, it was concluded that intramammary ozone gas application is highly effective in the treatment of subclinical mastitis caused by KNS and *Staphylococcus aureus* and may be an alternative to antibiotics but there is no curative effect in subclinical mastitis originated from *Streptococcus* spp.

**Keywords:** Subclinical mastitis, Cow, Antibiotic, Ozone.

### Giriş

Klinik mastitislerden 20-40 kat daha sık şekillenen, çok hızlı yayılan ve bir sürü problemi olan subklinik mastitisler, süt veriminde azalmaya yol açması ve süt ürünlerindeki kaliteyi olumsuz etkilemesinden dolayı süt inekçiliğinde kritik öneme sahiptir (Deveci ve ark., 1994; Hogeveen ve Osteras, 2007; Philpot ve Nickerson, 2000). Subklinik mastitislerde, sütte somatik hücre (SHS) ve bakteri

sayısındaki artış süt ürünlerinin raf ömrünü kısaltmakta, sütün tadını değiştirmekte, peynir yapımında önemli olan kazein miktarının azalmasından dolayı elde edilen peynir miktarında düşüşe yol açabilmektedir (Baştan, 2013; Hortet ve Seegers, 1998; Mundan ve ark., 2015).

Daha önce yapılan çalışmalarda subklinik mastitis insidansı, Konya yöresi süt ineklerinde %23

(Bozkır, 1985), Van yöresinde %7.84 (Gürtürk ve ark.,1998), Afyon yöresinde %43.70 (Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001), Hatay yöresinde %71.80 (Ergün ve ark., 2004), Kırıkkale yöresinde %54.37 (Macun ve ark., 2011) olarak bildirilmiştir. Subklinik mastitis vakalarında en sık *S. aureus*, *S. agalactia*, *S. dysgalactia*, *S. uberis*, mikoplazma türleri ve *C. bovis* izole edilmektedir (Quinn ve ark., 1994; Schalm ve ark., 1971; Tekeli ve ark., 1985). Özellikle *S. aureus* ve *S. agalactia*, meme bezinin saprofit mikroorganizmalarıdır ve sağım esnasında, sağımıcının eli, meme temizliğinde kullanılan malzemeler ve sağım başlıklarıyla kolayca yayılırlar (Baştan, 2013; Devenci ve ark., 1994; Enevoldsen ve ark., 1995). Ayrıca primer mastitis etkenlerine karşı mastitis kontrol programlarının uygulandığı sürülerde, sekonder mastitis patojenleri olarak değerlendirilen Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) %7-30 arasında değişen oranlarda izole edilmektedirler (Baştan, 2013; Zadoks ve Watts, 2009).

Subklinik mastitislerin tanısında sütteki SHS'daki değişiklikler, California mastitis testi (CMT), strip cup, somatik hücre sayımı, elektriksel iletkenlik (Eİ), katalaz, Whiteside, Wisconsin gibi tekniklerle belirlenebilmektedir. Ayrıca N-asetil-β-D-glukozaminidaz (NAGase), β-glukuronidaz ve laktatdehidrojenaz (LDH) gibi enzimlerin de kullanılabileceği bildirilmektedir (Chagunda ve ark., 2006; İlhan, 2018). Ancak bu tekniklerin tek başına yeterli olmadığı, kesin teşhiste kültür yönteminin "altın standart" olduğu belirtilmektedir. Çünkü kültür yöntemi ile etkenin belirlenmesinin, kullanılacak antibiyotiklerin tespit edilmesinde de önemli olduğu ifade edilmektedir (Baştan, 2013; Devenci ve ark., 1994; İlhan, 2018).

Subklinik mastitis vakalarında en fazla kullanılan tedavi şekli meme içi yolla yapılan geniş spektrumlu antibiyotik uygulamalarıdır (Philpot ve Nickerson, 2000; Sekkin ve Kum, 2010; Vural ve ark., 2016). Fakat antibiyotik kullanımı, sütte kalıntı problemlerinden dolayı süttün tüketimde kullanılamamasına ve dökülmesine yol açmaktadır. Sütte kalıntı bırakmayan, güvenli ve ekonomik bir tedavi yöntemi olan ozonun alternatif bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (Ogata ve Nagahata, 2000).

Tedavide kullanılan medikal ozon; %5 ozon ve %95 oksijen karışımından oluşan bir bileşimdir. Ozon lökositlerden sitokinlerin üretimini aktivasyonu ve immunoglobulin üretiminde artış sağlayarak fagositozisi stimüle etmektedir. Ozonun bakterisidal etkileri, sitoplazmik membranın ve bakteri hücre çeperinin fosfolipidlerini ve lipoproteinlerinin bütünlüğünü bozmasıyla meydana gelmektedir. Gram negatif bakteriler, bu zar bileşiklerinin peroksidasyonu nedeniyle daha

duyarlıdır. Virüsler, fosfolipitler ve glikoproteinler tarafından yapılandırılmış kapsid bölgesine hasar vermesinden kaynaklanır (Ducusin ve ark., 2003; Moreira ve ark., 2014; Ohtsuka ve ark., 2006; Roman, 2014; Sordillo ve ark. 1997). Bununla birlikte, ozonun hücre içi bakteri ve virüsleri etkisiz hale getiremediği belirtilmektedir (Bocci ve Paolo, 2004).

Sunulan çalışmada mikrobiyolojik izolasyon ve identifikasyon yapılarak subklinik mastitis teşhisi konulan hayvanlarda antibiyotik tedavisine alternatif olabileceği düşünülen ozon gazı tedavisinin iyileştirici etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 30/12/2015 tarih ve 2015/10-8 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Çalışma Hatay ili Reyhanlı ilçesinde süt sığırcılığı işletmelerinde yetiştirilen laktasyondaki Holştayn ırkı ineklerde gerçekleştirildi. İnekler sağım makinaları ile günde 2 defa sağılmaktaydı ve bağlı sistem ahırlarda barındırılmaktaydı.

Çalışmadaki ineklerin %45 (9/20)'inin doğumdan sonra ilk 3 ayda, %35 (7/20)'inin 4. ve 5. aylarda, %20 (4/20)'sinin ise 6. ve 7. aylarda olduğu görüldü.

Çalışmada ilk olarak, hayvanların laktasyon dönemi izleme formuna kaydedildi. Subklinik mastitisli hayvanların tespiti amacıyla, dört meme lobundan ayrı ayrı alınan süt örneklerine CMT uygulandı ve CMT pozitif reaksiyon veren toplam 25 ineğe ait 29 meme lobundan bakteriyolojik muayene amacıyla numune alındı. Bu amaçla hasta meme lobuna ait meme başı %70 alkol solüsyonuyla temizlendikten sonra ilk birkaç çekimlik süt bir kap içine sağıldı ve bakteriyolojik ekim amacıyla süt örnekleri 50 ml'lik steril tüplere alındı. Süt örneklerinin soğuk zincir kurallarına uygun olarak laboratuvara ulaştırıldı ve süt örneklerinden etken izolasyonu yapıldı.

İnekler iki gruba ayrıldı, her iki gruptaki hayvanlara tedaviye başlanılmadan önce IV yolla 30 I.U oksitosin (Pitosal®, Alke) uygulandı ve memeler iyice boşaltıldı. İlk gruba (Grup I, n=10) 3 gün süresince ve 24 saat ara ile 100 mg/ml novobiosin sodyum, 150 mg/ml neomisin sülfat, 100 mg/ml prokain penisilin, 125 mg/ml dihidrostreptomisin sülfat, 10 mg/ml prednizolon içeren antimastit preparatı (Tetra delta LC®, Pfizer) meme içi yolla uygulandı. İkinci gruba (Grup II, n=10) ozon jeneratöründen (Genozon®) 6 mg/lt ozon hesabıyla, 1-5 lt arası ozon/oksijen gazı, 1 lt/dk hesabıyla meme içi yolla 3 gün uygulandı.

## Mikrobiyolojik Muayene

Tedavi öncesinde, süt örneklerine, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında mikrobiyolojik ekim yapılarak, etken izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı.

Süt örnekleri Gram boyama yapılarak mikroskopta incelendi ve bakteriyoskopik bulgular kayıt edildi. Süt örneklerinin Kanlı Agar, MacConkey Agar'a ekimleri yapıldı ve 37°C de 24-48 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edildikten sonra üreyen koloniler biyokimyasal testler kullanılarak identifiye edildi. Ayrıca tüm bu numunelerden Sabouraud Dextrose Agar'a ekimler yapılarak 25°C de 7-10 gün süreyle aerobik ortamda inkübe edildikten sonra *Aspergillus spp.*, ve *Candida spp.* yönünden cins düzeyinde identifikasyonları yapıldı (Quinn ve ark., 1994; Schultz ve ark., 2004).

Tedavi bitiminden 7 gün sonrasında, iki gruptan da bakteriyolojik ekim yapmak üzere süt örnekleri alındı ve bakteriyolojik iyileşme oranları bakteri üremesine bakılarak tespit edildi.

## İstatistiksel Değerlendirmeler

Elde edilen değerler SPSS 23.0 programında Ki-Kare testi ile değerlendirildi.

## Bulgular

Çalışmada CMT pozitif reaksiyon veren 5 ineğe ait 5 meme lobunda bakteriyolojik muayene sonucunda herhangi bir üreme olmadı ve çalışmaya dahil edilmedi. Yirmi inekte toplam 24 meme lobu ise subklinik mastitisli olarak saptandı. Her iki grupta da 2 ineğin 2 meme lobunda mastitis olduğu belirlendi. Subklinik mastitis tespit edilen 20 inekten alınan 24 adet süt numunesinden yapılan mikrobiyolojik ekim sonucunda 14 adet KNS, 4 adet *S. aureus*, 2 adet *Streptococcus spp.*, 3 adet KNS ve *Streptococcus spp.* ve 1 adet KNS ve *S. aureus* birlikte izole edildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Süt numunelerinden izole edilen mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Grup I		Grup II	
	n	%	n	%
KNS	9	75	5	41.66
<i>S. aureus</i>	2	16.67	2	16.67
<i>Streptococcus spp.</i>	-	-	2	16.67
KNS+ <i>Streptococcus spp.</i>	-	-	3	25
KNS+S. aureus	1	8.33	-	-
<b>Toplam</b>	<b>12</b>		<b>12</b>	

KNS (Koagulaz negatif stafilkoklar)

Grup I'de süt örneklerinde üreyen bakterilerin 9 adet KNS (%75), 2 adet *S. aureus* (%16.67) ve 1

adet KNS + *S. aureus* (%8.33) olduğu görüldü (Tablo 1), bakteriyolojik iyileşme oranları sırasıyla %77.77 (7/9), %50 (1/2) ve %100 (1/1) olarak saptandı (Tablo 2). Grup I'in toplamda bakteriyolojik iyileşme oranı ise %75 (9/12) olarak belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 2.** Grup I'deki süt numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların mikrobiyolojik iyileşme bulguları

Mikroorganizma	n	Mikrobiyolojik iyileşme, (%)
KNS	9	77.77 (7/9)
<i>S. aureus</i>	2	50 (1/2)
KNS+ <i>S. aureus</i>	1	100 (1/1)
<b>Toplam</b>	<b>12</b>	<b>75 (9/12)</b>

KNS (Koagulaz negatif stafilkoklar)

Grup II'de süt örneklerinde üreyen bakteriler, 5 adet (% 41.66) KNS, 2 adet *S. aureus* (%16.67), 2 adet (%16.67) *Streptococcus spp.* ve 3 adet KNS+*Streptococcus spp.* olarak tespit edildi (Tablo 1). Bakteriyolojik iyileşme oranları sırasıyla % 100 (5/5), % 100 (2/2), % 0 (0/2) ve %0 (0/3) olarak saptandı (Tablo 3). Grup II'nin toplamda bakteriyolojik iyileşme oranı ise %58.33 (7/12) olarak belirlendi (Tablo 3).

**Tablo 3.** Grup II'deki süt numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların mikrobiyolojik iyileşme bulguları

Mikroorganizma	n	Mikrobiyolojik iyileşme (%)
KNS	5	100 (5/5)
<i>S. aureus</i>	2	100 (2/2)
<i>Streptococcus spp.</i>	2	0 (0/2)
KNS+ <i>Streptococcus spp.</i>	3	0 (0/3)
<b>Toplam</b>	<b>12</b>	<b>58.33(7/12)</b>

KNS (Koagulaz negatif stafilkoklar) P>0.05

Çalışmada, KNS+*Streptococcus spp.* birlikte izole edilen 3 örnekte de tedaviden sonra KNS'lerin tekrar üremediği fakat *Streptococcus spp.*'lerin ürediği görüldü.

## Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışmada mikrobiyolojik izolasyon ve identifikasyon yapılarak subklinik mastitis teşhisi konulan hayvanlarda antibiyotik tedavisine alternatif olabileceği düşünülen ozon gazı tedavisinin iyileştirici etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Subklinik mastitis olgularına en fazla *S. aureus*, *Streptococcus spp.* ve *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan bakteriler neden olmaktadır (Quinn ve ark., 1994). Subklinik mastitislerde izole edilen *S. aureus* oranlarını Akay (1986) % 45.52, Dinç ve ark. (1991) % 51.1, Hadimli ve Uçar (1999) %



33.7, Yıldız (2003) % 39.45, Ergün ve ark. (2004) % 25.1, Sevinti ve Şahin (2009) %34.3, Tel ve ark. (2009) %32.5, Büyükcangaz ve ark. (2012) %76.11 olarak bildirmişlerdir.

Primer mastitis etkenlerine karşı mastitis kontrol programları uygulanan sürülerde KNS'ler çok sık izole edilen mikroorganizmalardır. Bu sürülerde prevalansın %10 ile %50 arasında değiştiği belirtilmektedir (Baştan, 2013; Büyükcangaz ve ark., 2012; Şeker ve Özenç, 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda Kırkan ve ark. (2005) %20, Tel ve ark. (2009) %27.5, Türütoğlu ve ark. (1995) % 31.1, Ergün ve ark. (2004) %42.6, Sevinti ve Şahin (2009) % 28.3, Çokal ve Konuş (2012) %17.1, Büyükcangaz ve ark. (2012) % 23.88 oranında KNS izole etmişlerdir. Çalışmada, en fazla izole edilen etkenin KNS olduğu, ikinci sırada ise *S. aureus*'un geldiği görülmektedir (Tablo 1).

Ergün ve ark. (2004), 200 süt örneğinde gerçekleştirdikleri izolasyon ve identifikasyon çalışmasında, örneklerin 22'sinde (%11) miks enfeksiyon tespit ettiklerini belirtmektedirler. Çalışmada örneklerin 4 tanesinde (%16.67) miks enfeksiyon tespit edildi ve bu örneklerin KNS + *S.aureus* ile KNS+*Streptococcus* spp. olduğu görüldü (Tablo 1).

Subklinik mastitislerinin ön teşhisinde CMT kullanılarak %90'dan daha fazla oranlarda tanı konulabildiği belirtilmektedir (Alaçam ve ark., 1989; İlhan, 2018). Sevinti ve Şahin (2009) CMT pozitif 61 inekten 79 süt örneği aldıklarını bu örneklerin 67 (%84.8)'sinde etken izole ettiklerini belirtmektedirler. Çalışmada CMT pozitif reaksiyon veren toplam 25 ineğe ait 29 meme lobunda bakteriyolojik muayene amacıyla numune alındı ve muayene sonucunda 24 (%82.75) örnekte etken ve/veya etkenler izole edildi.

Subklinik mastitis tedavisinde en yaygın kullanılan yöntem meme içerisine 12-24 saat aralıklarla 3-5 gün geniş spektrumlu antibiyotiklerin verilmesidir (Baştan, 2013). Çalışmada Grup I'deki hayvanlara 24 saat ara ile 3 gün boyunca 100 mg/ml novobiosin sodyum, 150 mg/ml neomisin sülfat, 100 mg/ml prokain penisilin, 125 mg/ml dihidrostreptomisin sülfat, 10 mg/ml prednizolon içeren antimastit preparatı meme içi yolla uygulandı ve bakteriyolojik iyileşme oranlarının KNS üreyenlerde %77.77, *S. aureus*'ta %50 ve KNS + *S. aureus* miks olan olguda ise %100 olduğu saptandı (Tablo 1).

Abay ve Bekyürek (2006), *S. aureus* izole edilen subklinik mastitisli 56 adet meme lobunda yaptıkları çalışmada, meme loblarını iki gruba ayırdıklarını, 1. grupta yer alan meme loblarına sefkionum, 2. gruptaki enfekte meme loblarına amoksisilin-klavulonik asit kombinasyonu uyguladıklarını, iyileşme oranlarını sırasıyla %85.71 ve %82.2 olarak

belirlediklerini bildirmişlerdir. Hadimli ve Uçar (1999), *S. aureus* kaynaklı subklinik mastitislerde amoksisilin-klavulonik asit kombinasyonu ile %82.4, Akan ve ark. (2002) amoksisilin-klavulonik asit kombinasyonu ile %93.4 başarı elde ettiklerini belirtmişlerdir. Yıldız (2003) subklinik mastitiste hasta meme loblarına 24 saat ara ile 3 kez lincomycin-neomycin uyguladığını ve *S. aureus* için %81.4 oranında iyileşme elde ettiğini ifade etmektedir.

Bakteriyel, viral ve fungal çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu bildirilen ozonun, mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisi ve sütte kalıntı bırakmaması mastitiste alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülmesine yol açmıştır (Liu ve ark., 2005; Ogata ve Nagahata, 2000). Li ve ark. (2013), ozonun 3-24 saat içinde nötrofil ve makrofajların fagositik etkinliğinde artış sağladığını belirtmektedirler. Ozonun, 10-80 ug/ml doz aralığındaki uygulamalarının herhangi bir yan etkisinin olmadığı ifade edilmektedir (Bocci, 2004; Li ve ark., 2013; Tylicki ve ark., 2004). Sertkol ve ark. (2018), çalışmalarında, ozonu meme başı kanalından 60 µg/mL, 24 saat ara ile 3 defa uyguladıklarını ve hayvanlarda herhangi bir reaksiyon gözlenmediğini belirtmektedirler. Çalışmada 6 mg/lt ozon gazı meme içi yolla uygulandı ve hayvanlarda herhangi bir reaksiyon gözlenmedi.

Kwon ve ark. (2005), kronik mastitisli 18 adet inekte yaptıkları çalışmalarında, hayvanları üç gruba ayırdıklarını, kontrol grubundaki ineklere 3 gün boyunca norfloksasin uyguladıklarını, ozon grubundaki 1. gruptaki ineklere 7 gün meme içi 0.1 ppm ozon gazı, 2. gruptaki ineklere ise 3 gün meme içi 1 ppm ozon gazı uyguladıklarını belirtmişlerdir. Grup I'deki hayvanların hasta meme loblarına ait somatik hücre sayılarının tedavinin başlamasından sonraki 7.günde düştüğünü fakat kontrol grubunun somatik hücre sayısından daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Grup II'deki hayvanların somatik hücre sayılarının ise tedavinin başlamasından sonraki 7.günde önemli oranda ( $p<0.05$ ) düştüğünü ve kontrol grubunun somatik hücre sayısından daha düşük olduğunu belirlemişler ve 3 gün 1 ppm ozon tedavisinin mastitiste iyileştirici etkisinin olduğu kanaatine varmışlardır. Çalışmada ozon grubundaki (Grup II) subklinik mastitis tespit edilen 12 meme lobunda bakteriyolojik iyileşme oranı %58.33 (7/12) olarak belirlendi (Tablo 3).

Liu ve ark. (2005), 24 inekte, kronik mastitisli 49 meme lobunda yaptıkları çalışmalarında, SHS'larına göre 4 grup oluşturmuşlardır. Kontrol grubu (7 meme lobu), deney grubu A (10 meme lobu,  $50-100 \times 10^4$  / ml), deney grubu B (14 meme lobu,  $100-300 \times 10^4$ ) ve deney grubu C (18 meme lobu,  $> 300 \times 10^4$  / ml) olarak belirlemişler, kontrol

grubuna, 3 gün süresince günde iki kez meme içi norfloksasin, deney gruplarına ise 3 gün süresince günde iki kez meme içi 10 mL (200 ppm) ozonlanmış yağ uyguladıklarını belirtmişlerdir. Tedaviden bir hafta sonra alınan süt örneklerinde SHS'nin kontrol grubunda önemsiz derecede yükseldiğini, deney gruplarında ise düştüğünü tespit etmişler. Özellikle B ve C gruplarında SHS'nin önemli ölçüde ( $p<0.01$ ) düştüğünü gözlemlemişlerdir. Pereira ve Garcia (2006) CMT ve SHS'larına bakarak subklinik mastitis teşhisi koydukları, 22 ineğe ait 40 meme lobuna ozon jenarötörü vasıtasıyla 5 gün süresince 2 mg/sn hesabıyla toplamda her meme lobuna 30 mg ozon uyguladıklarını, tedavi bitiminde yaptıkları CMT testi ve SHS'larında istatistiki olarak anlamlı farklılıklar ( $p<0,05$ ) gösterdiğini belirtmektedirler. Çalışmada meme içi ozon tedavisinin KNS ve *S. aureus* kaynaklı subklinik mastitlerde bakteriyojik iyileşme oranlarının %100 olduğu saptandı (Tablo 3).

Ozon preparatlarının *S. dysgalactiae* ve *S. uberis*'e karşı etkili, ancak *S. aureus*, *E. coli*, *A. pyogenes*'e karşı kısmen etkili veya etkisiz olduğu belirtilmektedir (Durucic ve ark., 2015; Scrollavezza ve ark., 1997). Moreira ve ark. (2014), subklinik mastitisli 20 inekte yaptıkları çalışmalarında, 6 ineği kontrol olarak bıraktıklarını, 14 ineğe ait hasta meme loblarına 10 mg/ml konsantrasyonda 720 ml ozon gazı uyguladıklarını belirtmişler, tedaviden hemen önce, 24 saat sonra ve 48 saat sonra aldıkları süt örneklerinde SHS ve toplam bakteri sayısına baktıklarını, SHS'larında herhangi bir değişiklik olmadığını, toplam bakteri sayılarında ise *S. agalactiae*, *S. aureus* ve *A. pyogenes* sayılarının değişmediğini, *Corynebacterium bovis* sayısında ise düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Sertkol ve ark. (2018) akut mastitisli ineklerde yaptıkları çalışmalarında, meme başı kanalından 50 ml ozon/oksijen gazı (60µg/mL ozon) 24 saat ara ile 3 gün süreyle uyguladıklarını, 7 gün sonra aldıkları süt örneklerinde, ozon tedavisinin KNS'dan kaynaklanan akut mastitlerde %87.5, *Streptococcus* spp. ve maya kaynaklı akut klinik mastitlerde ise iyileştirici etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Çalışmada ozon grubundaki (Grup II) 2 adet süt numunesinde (%16.67) *Streptococcus* spp. izole edildi, alt tür belirlenemedi ve tedavi sonucunda bakteriyolojik iyileşme oranı %0 (0/2) olarak belirlendi (Tablo 3). Ayrıca KNS+*Streptococcus* spp. birlikte izole edilen 3 örnekte de tedaviden sonra KNS'ların tekrar üremediği fakat *Streptococcus* spp.'lerin ürediği tespit edildi (Tablo 3). Meme içi ozon gazı uygulamasının *Streptococcus* spp.'den kaynaklanan subklinik mastitlerde iyileştirici etkisinin olmadığı görüldü.

Sonuç olarak, meme içi ozon gazı uygulamasının KNS ve *Staphylococcus aureus*'dan kaynaklanan subklinik mastitislerin tedavisinde etkili olduğu ve

antibiyotiklere alternatif olabileceği, *Streptococcus* spp. kaynaklı subklinik mastitlerde ise iyileştirici etkisinin olmadığı kanısına varıldı.

## Teşekkür

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurum Koordinatörlüğü tarafından 16328 nolu proje olarak desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Abay M, Bekyürek T, 2006: Laktasyondaki sütçü ineklerde staphylococcus aureus'un neden olduğu subklinik mastitislerin tedavisinde sefkuinom ve amoksisilin+ klavulanik asit'in etkinliklerinin karşılaştırılması. *Sağlık Bilim Derg*, 15(3), 189-193.
- Akan M, Kökçü L, Öncel T, Eken S, 2001: Mastitislerden izole edilen stafilocok suşlarının beta laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Hekim Mikrobiyol Derg*, 1(2), 31-34.
- Akay Ö, 1986: Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staph. aureus* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını üzerinde bir araştırma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 33, 1-11.
- Alaşam E, Tekeli T, Erganiş O, İzgi N, 1989: İnek ve mandalarda subklinik mastitislerin tanısı, etkenlerin izolasyonu ve bunlara karşı etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. *SÜ Vet Fak Derg*, 5(1), 91-101.
- Baştan A, 2013: İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. İkinci baskı, Kardelen Ofset, Ankara.
- Bocci V, Paolo ND, 2004: Oxygenation-ozonization of blood during extracorporeal circulation (EBOO). Part III: a new medical approach. *Ozone: Sci Engin*, 26(2), 195-205.
- Bozkır M, 1985: Konya ve yöresinde süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitis olgularından aerobik patojenik etken izolasyonu ve identifikasyonu ile bunlara etkili antibiyotiklerin tespiti. *Etlik Vet Mikrobiol Enst Derg*, 5 (8-9), 104-138.
- Büyükcangaz E, Mat B, Alrahim A, Khider M, 2012: Subklinik mastitisli sığır sütlerinin mikrobiyolojik analizi ve izolatların antimikrobiyal direnç profili. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 31(2), 35-44.
- Chagunda MG, Larsen T, Bjerring M, Ingvarsten K, 2006: L-lactate dehydro genase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J Dairy Res*, 73(4), 431-440.
- Çokal Y, Konuş R, 2012: Subklinik Mastitisli İneklerin Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu. *Balikesir Sağlık Bilim Derg*, 1(2), 65-69.
- Deveci H, Apaydın AM, Kalkan C, Öcal H, 1994: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Birinci Baskı, F.Ü. Basımevi, Elazığ.
- Dinç DA, Erganiş O, Güler M, Uçan US, 1991: İneklerin subklinik mastitislerinde Baytril'in etkisi. *Hayv Araş Derg*, 1, 12-15.
- Ducusin RJT, Nishimura M, Sarashina T, Uzuka Y, Tanabe S, Otani M, 2003: Phagocytosis of bovine blood and

- milk polymorphonuclear leukocytes after ozone gas administration in vitro. *J Vet Med Sci*, 65(4), 535-9.
- Duricic D, Valpotic H, Samardzija M, 2015: Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Anim Reprod Sci*, 159, 1-7.
- Enevoldsen C, Grihn YT, Thysen I, 1995: Dairy cows characteristics related to staphylococcus aureus isolation from quarter samples. *J Dairy Res*, 62(1), 69-81.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Cantekin Z, 2004: Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Vet Bil Derg*, 20, 25-28.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İH, Gülhan T, 1998: Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiolojisi üzerine bir çalışma. *YYÜ Vet Fak Derg*, 9(1-2), 1-4.
- Hadimli HH, Uçar M, 1999: Klinik ve subklinik mastitislerin sağıtımında amoksisilin+ klavulonik asit'in etkinliği. *Hayv Araş Derg*, 9, 65-70.
- Hogeveen H, Osteras O, 2007: Mastitis management in an economic framework. In: Mastitis in Dairy Production, Ed.: H. Hogeveen, 2nd ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p: 41-51.
- Hortet P, Seegers H, 1998: Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med*, 37(1-4), 1-20.
- İlhan Z, 2018: Mastitiste Teşhis ve İmmünoprofilaksi. *Türk Klin Vet Sci-Obstet Gynecol-Spec Top*, 4(2), 1-6.
- Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O, 2005: Identification and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Türk J Vet Anim Sci*, 29(3), 791-796.
- Kuyucuoğlu Y, Uçar M, 2001: Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, 1, 19-24.
- Kwon HJ, Liu J, Jo SN, Song KH, Kim DH, Jun MH, Yoon HI, 2005: Therapeutic effect of ozone gas on bovine mastitis. *J Vet Clin*, 22(4), 314-317.
- Li Z, Tighe RM, Feng F, Ledford JG, Hollingsworth, JW, 2013: Genes of innate immunity and the biological response to inhaled ozone. *Journal Biochem Mol Toxicol*, 27(1), 3-16.
- Liu J, Wang Z, Xie Z, Ma WA, 2005: Therapeutic effect of ozonated oil on bovine mastitis. *J Vet Clin*, 22(4), 318-321.
- Macun HC, Yağcı İP, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M, 2011: Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde Etkin izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8 (2), 91-95.
- Moreira L, Fernandes A, Lima CJ, Kozusny-Andreani DI, Zangaro RA, Rodriguez Z, 2014: Efeitos da aplicação intra-mamaria no tratamento de mastite em bovinos utili zando a ozonioterapia. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomedica-CBEB. Basil. pp. 61.
- Mundan D, Meral BA, Demir A, Doğaner M, 2015: Süt sığırcılığı işletmelerinde sütteki toplam bakteri ve somatik hücre sayısının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 4(2), 84-89.
- Ogata A, Nagahata H, 2000: Intramamary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *J Vet Med Sci*, 62(7), 681-686.
- Ohtsuka H, Ogata A, Terasaki N, Koiwa M, Kawamura S, 2006: Changes in leukocyte population after ozonated autohemoa administration in cows with inflammatory diseases. *J Vet Med Sci*, 68(2), 175-8.
- Pereira MTC, Garcia AC, 2006: Eficacia da ozonioterapia no tratamento de mastite subclinica de vacas em lactacao. *Vet Not*, 12(2), 109-115.
- Philpot WN, Nickerson SC, 2000: Winning the fight against mastitis. *Westfalia Surge Dairy Sci*, Naperville, USA. pp. 313-317.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, 1994: Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London, England, pp. 209-236.
- Roman M, 2011: IVC Journal Issue: V314 Ozone Therapy in the Veterinary Practice, <http://www.ivcjournal.com>, Erişim tarihi: 18.06.2019.
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC, 1971: Bovine Mastitis. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Scrollavezza P, Ablondi M, Pogliacomini B, Guareschi D, Dall'Aglio R, Poldi R, Pezzoli G, 1997: Ozone treatment in mastites, metritis and retention of fetal membranes in the cows. Atti 2 Intern. Symp. Ozone Application, Havana, Cuba.
- Sekkin S, Kum C, Kırkan S, Güles O, Akar F, 2010: Sütçü ineklerde S. aureus'un neden olduğu subklinik mastitisin sağıtımında sefoperazon danofloksasin kombinasyonunun etkinliği. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(1), 97-104.
- Sertkol C, Sarıbay MK, Cantekin Z, 2018: Sütçü ineklerde akut klinik mastitislerde meme içi ozon tedavisinin iyileştirici etkisi. *F U Vet J Health Sci*, 32 (3), 185-190.
- Sevinti DA, Şahin M, 2009: Sığır mastitislerinden izole edilen stafilokok suşlarının beta-laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması. *Vet Bil Derg*, 25 (1-2), 23-28.
- Schultz R, Smith PJ, Hogan KL, Love JS, 2004: Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol*, 102 (1-2), 33-42.
- Sordillo LM, Shafer-Waver K, De Rosa D, 1997: Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80(8), 1851-1865.
- Şeker E, Özenç E, 2010: Mastitisli inek sütlerinden izole edilen koagulaz negatif stafilokokların antibiyotik dirençlilikleri. *YYÜ Vet Fak Derg*, 21(2), 107-111.
- Tekeli T, Baysal T, Gökçay Y, 1985: İneklerde subklinik mastitislerin kuru dönemde penisilin+streptomisin kombinasyonu ile sağıtımı üzerine araştırmalar. *SÜ Vet Fak Derg*, 1(1): 71-79.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Kaya NBA, 2009: Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *FU Vet J Health Sci*, 23(2), 101-106.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salıkoğlu H, Öztürk M, 1995: Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*, 26(2), 125-137.

Tylicki L, Biedunkiewicz B, Nieweglowski T, Chamienia A, Slizien AD, Luty J, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B, 2004: Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: Influence on lipid profile and endothelium. *Artif Organs*, 28(2), 234–237.

Vural R, Ergün Y, Özenç E, 2016: Büyük Ruminantlarda Mastitis. Alınmıştır “Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları”, Ed: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Medipres, Malatya. s. 149-259.

Yıldız A, 2003: Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde Lincomycin-Neomycin kombinasyonu ile meme içi tedavinin etkinliği. *FU Vet J Health Sci*, 17(1), 65-69.

Zadoks RN, Watts JL, 2009: Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is

superior to phenotyping. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 20-28.

\*\* : Bu çalışma, 2019 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında yapılan aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

**\*Yazışma Adresi:** Mustafa Kemal SARIBAY  
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Tayfur Sökmen  
Kampüsü, 31040, Antakya/HATAY  
**e-mail:** saribaymk@yahoo.com

## Macroanatomic and Histological Examination of the Trachea and Syrinx in Budgerigars and Canaries

Ozan GÜNDEMİR<sup>1,a,\*</sup>, Hasan ALPAK<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Istanbul University -Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Avcılar, Istanbul, Turkey.  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3637-8166, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-1129-971X

Geliş Tarihi: 28.11.2019

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Abstract:** The purpose of the present study is to examine and compare the *trachea* and *larynx caudalis* of budgerigars and canaries in a macroanatomic manner. 18 canaries and 29 budgerigars that were collected as dead from the clinics of the surrounding area were used in this study. The number of *cartilago trachea* was 46-47 in canaries; and 53-61 in budgerigars. Crossman's Triple Staining Method was used for histological examinations. 0.1% methylene blue solution was used to examine in a stereo microscope. Tracheobronchial-type syrinx was observed in both species. In canaries last 4-5 trachea rings were joined together to form the *tympanum*. It was observed that in all species the *trachea* rings were full. The *ligamentum annulare* and *musculus trachealis* were not observed in both species. While *pessulus* and *tympanum* were observed in canaries, they were not detected in budgerigars. *Musculi syringeales* was detected in budgerigars in an extremely developed structure. *Cartilagine bronchosyringeales* formed the last part of the *syrinx*; and it consisted 8-9 cartilages in canaries and 6-7 cartilages in budgerigars.

**Keywords:** Budgerigar, Canary, Syrinx, Trachea, Veterinary anatomy.

### Muhabbet Kuşları ve Kanaryalarda Trachea ve Syrinx'in Makroanatomik ve Histolojik İncelenmesi

**Özet:** Bu çalışmanın amacı, muhabbet kuşları ve kanaryaların trachea ve larynx caudalis'ini karşılaştırmalı olarak makroanatomik incelemektir. Çevre kliniklerden ölü olarak toplanan 18 kanarya ve 29 muhabbet kuşu bu çalışmada kullanıldı. Cartilago trachealis sayısının kanaryalarda 46-47, muhabbet kuşlarında ise 53-61 olduğu görüldü. Histolojik incelemeler için Crossman üçlü boyama yöntemi kullanılmıştır. Stereo Mikroskopta incelemek içinse % 0.1 metilen mavisi çözeltisi kullanılmıştır. Her iki türde de tracheobronchial tipte syrinx gözlemlendi. Trachea kıkırdaklarının tam bir halka şeklinde olduğu gözlemlendi. Ligamentum anulare ve musculus trachealis iki türde de görülmedi. Kanaryalarda pessulus ve tympanum görülürken, bu yapılar muhabbet kuşunda rastlanılmadı. Muhabbet kuşlarında ise oldukça gelişmiş yapıda musculi syringeales görüldü. Cartilagine bronchosyringeales'in syrinx'in son kısmını oluşturduğu görüldü; bu kısmı kanaryalarda 8-9 kıkırdak, muhabbet kuşlarında ise 6-7 kıkırdak meydana getirmişti.

**Anahtar Kelimeler:** Muhabbet kuşu, Kanarya, Syrinx, Soluk borusu, Veteriner anatomi.

### Introduction

The trachea which is consistent of *cartilagine tracheales*, begins just under the larynx and runs down in the median line and goes through the ventral of the esophagus before entering the chest area between the furcula (Getty, 1975; Nickel, 1977; Mathey; 1965).

The number of *cartilagine tracheales* changes between 108 and 126 in birds and unlike mammals they are not in the shape of "C", each cartilage consists of a full ring (Getty, 1975). *Musculus trachealis* and *ligamentum annulare* do not exist in birds (Getty, 1975; Onuk et al., 2010). The diameter of the rings measured as 3 mm at the widest parts; and 2-2.5 mm in the narrowest parts. The initial part of the trachea is flattened dorso-ventrally, circular in the central part, and flattened on both sides at final parts (Getty, 1975).

Unlike mammals, *larynx* is divided into two parts as; *larynx cranialis* and *larynx caudalis*. In birds, while *larynx cranialis* acts as a respiratory system organ, *larynx caudalis (syrinx)* acts as a sound organ and positioned in the *bifurcatio trachea* area over the basis of the heart (Demirsoy, 1992; Getty, 1975; Nickel, 1977; Yılmaz et al., 2012; Yılmaz et al., 2016).

Three types of syrinxes are observed in birds. If only the *cartilagine tracheales* participate in the formation of the syrinx, tracheal syrinx is formed; if only the *cartilagine bronchiales* participate in the formation of the syrinx, bronchial syrinx is formed, and if they both participate, the tracheobronchial-type syrinx is formed (Baumel et al., 1993; Getty, 1975; King and Mclelland, 1984).

The last rings of the trachea are wider compared to the previous ones (Getty, 1975). These

cartilages combine forming the *tympanum*. It was reported that 4 trachea rings form the *tympanum* in Denizli roosters, 3 in red hawks; 3 in ostriches, and 2 in geese (Kabak et al., 2007; Tasbas et al., 1994; Yıldız et al., 2005).

Pessulus is located at the end of the *tympanum*, consist of different structures that vary among species. It consists cartilage in chickens and quails, connective tissue in species such as pigeons (Bayram and Liman, 2000; Getty, 1975; King and McLelland, 1984; Nickel et al., 1977; Yıldız et al., 2005). The pessulus does not exist in penguins, pelicans and loons (Griffiths, 1994; Tasbas et al., 1994).

In the bird a ligament called *ligamentum interbronchiale* is located between the bronchi after the *bifurcatio* area (Getty, 1975; King and McLelland, 1984).

In the present study, the purpose was to demonstrate the morphological structures of the trachea and the syrinx, which is a sound organ, of canaries and budgerigars, known for their beautiful voices, and to make comparisons between these two species.

## Materials and methods

18 canaries and 29 budgerigars bred in Turkey were used as the study materials. Dead birds were collected from various breeding establishments and private clinics in the area.

Four canaries and seven budgerigars were used for the histological study. The birds were dissected according to literature (Çalışlar, 1977) and the trachea and syrinx were removed. The organs

were fixed in a buffer solution (10% formaldehyde) for three days. After fixation tissue sections were routinely processed and embedded in paraffin. 5-micron ( $\mu$ )-thick sections were taken and stained with Crossman's Triple Staining Method (Crossman, 1937). The stained slides were photographed and measured with light microscope (Leica, EG 1160).

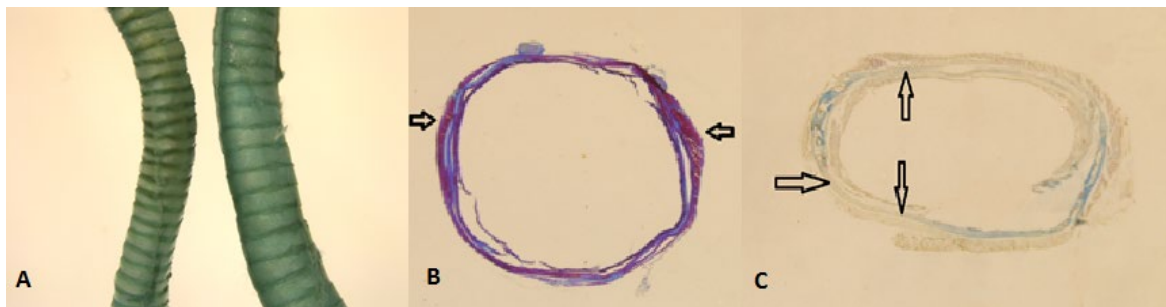
Fourteen canaries and twenty-two budgerigars were used for macro-anatomic examination studies. To prepare the cartilages of the trachea and syrinx for this examination, the materials were left in 70% alcohol for half an hour; and then submerged in 0.1% methylene blue solution for 15 minutes. Then, in order to remove excess methylene stain, they were kept in distilled water for one minute and then incubated in 50%, 70% and 90% alcohol, respectively. They were examined and photographed under stereomicroscope (Olympus, BX53F).

Ethical approval for the study was obtained from Istanbul University Ethical Board (2014/83).

*Nomina Anatomica Avium* was used as the basis for terminology (Baumel et al., 1993).

## Results

In budgerigars 53-61 and in canary 46 and 47 *cartilago trachea* was determined in the trachea. In both species the trachea rings were in full-ring shape, and they were not associated with the trachea ring before or after them. It was determined that connective tissue fills the neighboring trachea rings. *Ligamentum annulare* and *musculus trachealis* were not detected in any of the species (Figure 1A).



**Figure 1:** A: The image of the trachea under microscope (the trachea of the canary to the left; the trachea of the budgerigar to the right) (stereomicroscope), B: The image of the transversal section of the trachea in budgerigars; the tip of the arrow: *musculus tracheolateralis* (Crossman staining, 40x zoom) (light microscope), C: The tip of the arrow: The bone tissue in the *cartilago trachealis* (light microscope).

The rings were flattened in a dorso-ventral manner along all the progression of the trachea in budgerigars (Table 1). But in canaries, the last part of the trachea was found to be latero-lateral flattened.

The *musculus tracheolateralis* which provides the movement of trachea was observed in both

species (Figure 1B). Histologically, in some samples in both species, the cartilage tissue was determined to metaplasia to bone tissue (Figure 1C).

Tracheobronchial-type syrinx was observed in both species. In canary last 4-5 *cartilagine tracheosyringales* were joined together to form the *tympanum* (Figure 2A). In budgerigars,



**Table 1:** The values of the width of the cartilage rings along the progression of the trachea in budgerigars and canaries.

Material Number	DV	LL	DV	LL	DV	LL
	Upper 1/3		Middle 1/3		Lower 1/3	
B1	1588 $\mu$	1910 $\mu$	1542 $\mu$	1695 $\mu$	1218 $\mu$	1196 $\mu$
B2	1617 $\mu$	1701 $\mu$	1414 $\mu$	1691 $\mu$	1120 $\mu$	1278 $\mu$
B3	1552 $\mu$	1681 $\mu$	1454 $\mu$	1660 $\mu$	1221 $\mu$	1577 $\mu$
B4	1403 $\mu$	1773 $\mu$	1278 $\mu$	1569 $\mu$	1372 $\mu$	1392 $\mu$
B5	1373 $\mu$	1674 $\mu$	1305 $\mu$	1419 $\mu$	1070 $\mu$	1216 $\mu$
B6	1285 $\mu$	1793 $\mu$	1218 $\mu$	1462 $\mu$	1032 $\mu$	1031 $\mu$
B7	1318 $\mu$	1072 $\mu$	1069 $\mu$	1317 $\mu$	1175 $\mu$	1215 $\mu$
C1	1191 $\mu$	1605 $\mu$	1221 $\mu$	1750 $\mu$	1854 $\mu$	1181 $\mu$
C2	1191 $\mu$	1640 $\mu$	1210 $\mu$	1780 $\mu$	1851 $\mu$	1156 $\mu$
C3	1140 $\mu$	1595 $\mu$	1163 $\mu$	1745 $\mu$	1819 $\mu$	1222 $\mu$
C4	1150 $\mu$	1627 $\mu$	1116 $\mu$	1763 $\mu$	1829 $\mu$	1170 $\mu$

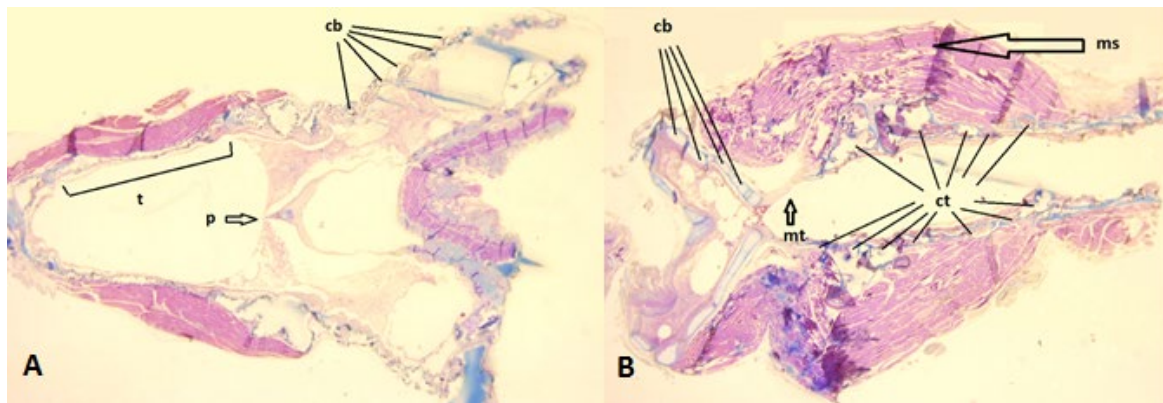
B: Budgerigars, C: Canaries, DV: Dorso-ventral, LL: Latero-lateral.

*cartilagine tracheosyringales* were consisted of 9 or 10 cartilages; and there was no connection between these cartilages. *Musculi syringeales* wrapped the *cartilagine tracheosyringales* in a strong manner (Figure 2B).

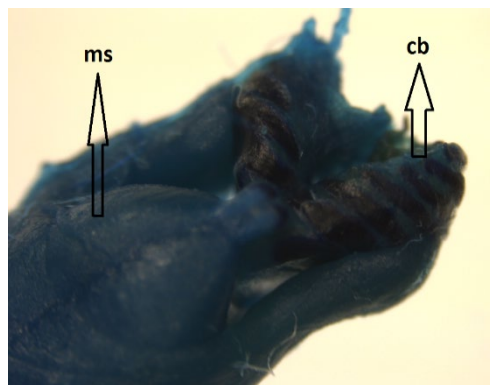
In canary significant *pessulus* were detected in the caudal area of the *tympanum*. This structure was not exist in budgerigars (Figure 2).

*Cartilagine bronchosyringales* formed the last part of the *syrinx*; and it consisted 8-9 cartilages in canaries and 6-7 cartilages in budgerigars (Figure 2).

*Musculi syringeales*, muscle layer which wrapped the tympanum, was more developed in budgerigars then in canaries (Figure 2, Figure 3).



**Figure 2:** p: *pessulus*, t: *tympanum*, ct: *cartilagine tracheosyringales*, mt: *membrana tympaniformis*, ms: *musculi syringeales*, cb: *cartilagine bronchosyringales* (Crossman staining, 40x zoom), A: Canary, B: Budgerigar. (stereomicroscope).



**Figure 3:** The dorsal view of the syrinx in budgerigars (stereomicroscope), ms: *musculi syringeales*, cb: *cartilagine bronchosyringales*.

## Discussion

The canary (*Serinus canaria*) member of Fringillidae family is a cage bird famous with its beautiful sound. The budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) is a domestic cage species which originates from Australia and member of Psittacidae family. Although both species are included in Passeriformes group, these two species differ from other birds in a morphologic manner (Demirsoy, 1992).

In the presented study, the number of *cartilagine tracheales* was determined to be between 53-61 in budgerigars; and 46-47 in canaries. This number presented to be varied

between 137-140 in geese (Onuk et al., 2010); 112-117 in Gerze rooster (Onuk et al., 2015); 53-57 in the *Pica pica* (Balkaya et al., 2016) and between 115 and 134 in seagulls (Gezer and Pazvant, 2010). In bird it has been reported that the number of the *cartilagine trachealis* is related with the length of the neck (Nickel et al., 1977).

In literature, the *cartilagine trachealis* of the birds were reported to be on top of each other (Cevik-Demirkan et al., 2007; Kabak et al., 2007; Mathey, 1965; Nickel et al., 1977; Onuk et al., 2010), yet in seagulls and geese this structure is reported to form letter "H" like structures as a result of fusion of the rings (Gezer and Pazvant, 2010; Onuk et al., 2010). In the presented study, this fusion was not determined in budgerigars and canaries. Each *cartilago trachea* was determined to form separate structures and there was only connective tissue between rings.

In birds tracheal rings are reported to be dorso-ventrally flat in the section following *larynx cranialis*, became more oval later, and flattened on both sides in the last section (Getty, 1975). In this study, it was determined that the cartilago of budgerigars were dorso-ventrally flat along the whole progression of the trachea. Latero-lateral diameter of the canaries was greater than the dorso-ventral diameter at the beginning and middle section of the trachea. However, the last part of the canaries was observed to be latero-lateral flattened.

In geese (Onuk et al., 2010), pigeons (Yıldız et al., 2005), seagulls (Gezer et al., 2012), ostriches (Yıldız et al., 2003), ducks (Frank et al., 2007) and in some domestic birds tracheobronchial-type syrinx was reported (Bayram and Liman, 2000; Cevik-Demirkan et al., 2007; Kabak et al., 2007; King, 1989). Similarly, in this study budgerigars and canaries presented to have tracheobronchial-type syrinx.

Tympanum is consistent of 3 or 4 cartilages in chickens, 4 in Denizli rooster, 2 in geese and Japanese quail and 3 in red hawk (Cevik-Demirkan et al., 2007; Getty, 1975; Kabak et al., 2007; Onuk et al., 2010; Tasbas et al., 1994). The *tympanum* was also detected in canaries and budgerigars, as mentioned in the literature before. The *tympanum* was consisting of the last 4-5 trachea rings in canaries and 9-10 rings in budgerigars; and some of the cartilage that formed the tympanum was ossified depending on age as in Denizli roosters, chickens, canaries and budgerigars (Cover, 1953; Getty, 1975; Tasbas et al., 1994).

The *pessulus*, which is located the caudal of the *tympanum* and involved in the formation of the sound is clearly visible in geese (Onuk et al., 2010), pigeons (King and Mclelland, 1984), chickens (Getty,

1975), ostriches (Yıldız et al., 2003), owls (Griffiths, 1994) and was significant in canaries. Like in loon, kiwi bird, black cormorant, pelican, penguin and in skylark (Griffiths, 1994; King and Mclelland, 1984; Tasbas et al., 1994) the *pessulus* was not detected in budgerigars. There was no difference between the *membrane tympaniformis*.

*Cartilagine bronchosyringales*, which forms the lower part of the *syrinx*, is consist of 6 cartilage rings in geese (Onuk et al., 2010), 3 cartilage rings in Japanese quail and ostriches, and 4 cartilage rings in the crows (Cevik-Demirkan et al., 2007; Yıldız et al., 2003; Chamberlain et al., 1968). In the presented study the *cartilagine bronchosyringales* was determined to form the last section of the *syrinx*, and was consisted of 8-9 cartilage in canaries, and 6-7 cartilage in budgerigars. It was reported that all birds have a well-developed *pessulus*. The most important finding of this study was the *pessulus* observed in canary does not exist in budgerigar. In addition, the *syrinx* muscles in budgerigars were much more developed than the canaries. By conducting other studies on different kinds of passeriformes that can imitate the human sound, these differences in the family of Psittacidae can be determined more detailed.

In conclusion, the *trachea* and *larynx caudalis* of budgerigars and canaries were examined in detail anatomically and histologically. The data obtained in the present study were compared with the respiratory system data of domestic birds reported in previous studies to show the differences and similarities.

## Acknowledgement

The presented study is produced from the PhD thesis of Ozan Gündemir (Advisor Prof. Dr. Hasan ALPAK) "Comparative Evaluation of Canary and Budgerian Respiratory System with Morphology and Morphology" and supported by İstanbul University, Scientific Research Projects Unit (Project No: 49666).

## References

- Balkaya H, Ozudoğru Z, Ozdemir D, Erbas E, Kara H, 2016: Saksaganda (*Pica pica*) larynx ve trachea üzerinde anatomik ve histolojik bir çalışma. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 5, 44-49.
- Baumel JJ, King AS, Breazile JE, 1993: Nomina Anatomica Avium. Publications of The Nuttall Ornithological Club No:23, Cambridge.
- Bayram G, Liman N, 2000: Bildircinlarda sirinks'in postnatal gelişimi üzerine morfolojik araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*, 24, 381-392.

- Chamberlain DR, Gross WB, Cornwell GW, Mosby HS, 1968: Syringeal anatomy in the common crow. *The Auk*, 85, 244- 252.
- Cover MS, 1953: Cross and microscopic anatomy of the respiratory system of the turkey. II. Larynx, trachea, syrinx, bronchi and lungs. *Am J Vet Res*, 14, 230-238.
- Crossman G, 1937: A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 69, 33-34.
- Çalışlar T, 1977: Tavuk Diseksiyonu. Ankara Üniversitesi Basım Evi. Ankara, Türkiye 28-31.
- Çevik-Demirkan A, Hazıroğlu RM, Kürtül İ, 2007: Gross Morphological and Histological Features of Larynx, Trachea and Syrinx in Japanese Quail. *Anat Histol Embryol*, 36, 215-219.
- Demirsoy A, 1992: Yaşamın temel kuralları, Omurgalılar (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler) cilt III, Birinci baskı, Meteksan. Ankara.
- Frank T, Probst A, König HE, Walter I, 2007: The syrinx of the male mallard (anas platyrhynchos) special anatomical features. *Anat Histol Embryol*, 36, 121-126.
- Getty R (1975): Sisson and Grossman's the Anatomy of the Domestic Animals, 5th edn, Vol. 1, 2. New York: W.B. Saunders Company.
- Gezer İnce N, Pazvant G, 2010: Martılarda larynx ve trachea üzerinde makro-anatomik çalışma. *Istanbul Üniv Vet Fak Derg*, 36, 1-6.
- Gezer İnce N, Pazvant G, Alpak H, 2012: Anatomical features of the syrinx in sea gulls. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 1-3.
- Griffiths CS, 1994: Monophyly of the Falciformes based on syringeal morphology. *The Auk*, 111, 787-805.
- Kabak M, Hazıroğlu RM, Orhan IO, 2007: The gross anatomy of larynx, trachea and syrinx in the longlegged buzzard (Buteo rufinus). *Anat Histol Embryol*, 36, 27-32.
- King AS, 1989: Functional Anatomy of the Syrinx. In: Form and Function in Birds. pp. 105-182. Academic Press, London.
- King AS, Mclelland J, 1984: Respiratory System. In: Birds their structure and function, Second ed., Bailliere Tindall, England, 110-144.
- Mathey WJ, 1965: Avian tracheal rings. *Poult Sci*, 44, 1465-1467.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E, 1977: Anatomy of the Domestic Birds. Verlag Paul Parey, Berlin- Hamburg, pp. 65-70.
- Onuk B, Hazıroğlu RM, Kabak M, 2010: The Gross anatomy of the larynx, trachea and syrinx in goose (Anser anser domesticus): Bronchi and sacci pneumatici. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16, 443-450.
- Onuk B, Kabak M, Gülbahar MY, Kabak Y, Demirci B, Karayığit M, Gültekin M, 2015: Gerze horoz ve tavuklarında larynx, trachea ve syrinx'in anatomik yapısının belirlenmesi. *Istanbul Üniv Vet Fak Derg*, 41, 92-98.
- Taşbaşı M, Hazıroğlu RM, Çakır A, 1994: Denizli horozunun solunum sisteminin morfolojisi II. Larynx, trachea, syrinx. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 41, 135-153.
- Taşbaşı M, Özcan Z, Hazıroğlu RM, 1986: Penguen dili ve ön solunum yollarının (larynx cranialis, trachea, syrinx) anatomik ve histolojik yapısı üzerinde bir çalışma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 33, 240-261.
- Yıldız B, Bahadır A, Akkoç A, 2003: A Study on the morphological structure of syrinx in ostriches (Struthio camelus). *Anat Histol Embryol*, 32, 187-191.
- Yıldız H, Yılmaz B, Arıcan I, 2005: Morphological structure of the syrinx in the Bursa roller pigeon (Columba livia). *Bull Vet Inst Pulawy*, 49, 323-327.
- Yılmaz B, Demircioğlu İ., Arıcan İ, Yılmaz R, 2016: Aseel Irkı Horoz ve Tavuklarda Larynx, Trachea ve Syrinx'in Anatomik ve Histolojik Yapısı. *Fırat Üniv Sag Bil Vet Derg*, 30(3), 211-216.
- Yılmaz B, Yılmaz R, Arıcan İ, Yıldız H, 2012: Anatomical Structure of the Syrinx in the Mallard (Anas platyrhynchos). *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 1(2), 111-116.

**\*Corresponding author:** Ozan GÜNDEMİR, Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Avcılar, Istanbul, Turkey  
**e-mail:** Ozan\_gundemir@hotmail.com

## Düvelerde Gebeliğin Son Döneminde Vitamin E ve Selenyum Uygulamalarının Postpartum Dönem Problemleri Üzerine Etkisi\*

Feyyaz KOCAARSLAN<sup>1,a</sup> Hayrettin ÇETİN<sup>1,b,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Aydın, Türkiye.  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-9527-612X, <sup>b</sup>ORCID:0000-0001-9010-0993

Geliş Tarihi: 14.01.2020

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Özet:** Bu çalışmada düvelerde prepartum dönemde yapılan vitamin E ve Se enjeksiyonunun postpartum dönemde görülen retensiyon sekondinarum, puerperal akut metritis, puerperal mastitis ve postpartum östrüs görülme oranı üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışma materyalini, İzmir ilinde özel bir damızlık süt sığırları işletmesinde bulunan 22-26 aylık yaşta, 104 damızlık holstein ırkı düve oluşturdu. Materyal olarak seçilen düveler 2 gruba ayrıldı. Uygulama grubundaki hayvanlara (Grup 1, n=52), beklenen doğum tarihinden 10 gün önce vitamin E ve Se içeren preparat 15 ml intramusküler olarak enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara (Grup 2, n=52) ise 5 ml izotonik NaCl enjekte edildi. Çalışma sonucunda uygulama grubu düvelerin 3'ünde (%5.8) retensiyon sekondinarum tespit edilirken, kontrol grubunda ise 10 düvede (%19.2) retensiyon sekondinarum tespit edildi. Klinik metritis oranları kontrol grubunda %42.3 (n=22) uygulama grubuna %23.1 (n=12) göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi. Doğum sonrası mastitis gösterenlerin sayısı uygulama grubunda 12 (%23.1), kontrol grubunda 7 (%13.5) olduğu ve farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi. Postpartum 45 gün içinde östrüs gösteren düvelerin sayısı da uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla 17 (%32.7) ve 18 (%34.6) olarak bulundu, farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sonucunda; yapılan uygulamanın retensiyon sekondinarum ve puerperal metritis olgularının oranını düşürdüğü, buna karşın puerperal mastitis ve postpartum östrüs görülme oranına herhangi bir etkisinin olmadığı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Düve, Postpartum, Selenyum, Vitamin E.

### Effect of Prepartum Treatment of Vitamin E and Selenium on Postpartum Reproductive Problems of Dairy Heifers

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of prepartum vitamin E and Se injection in heifers on the rate of retentio secundinarum, puerperal acute metritis, puerperal mastitis and postpartum oestrus seen in the postpartum period. The material of the study was composed of 104 broodstock Holstein breed heifers (22-24 months of age) from a dairy cattle farm in İzmir. These heifers were divided into 2 groups as study group (n: 52) and control group (n: 52). To study group animals, 15 ml vitamin E and Se preparation was intramuscularly injected 10 days before the expected date of birth. And to control group animals, 5 ml isotonic NaCl was intramuscularly injected. As a result of the study; retentio secundinarum was detected in 3 (5.8%) of heifers in the application group, while retentio secundinarum was detected in 10 heifers (19.2%) in the control group. Clinical metritis rates were found to be statistically significantly higher in the control group than 42.3% (n = 22) and 23.1% (n = 12). While the number of postpartum mastitis patients was 12 (23.1%) in the application group, this number was 7 (13.5%) statistically insignificant in the control group. The number of heifers showing oestrus within the postpartum 45 days was also statistically insignificant in the application and control groups, 17 (32.7%), and 18 (34.6%), respectively. As a result of this study; it has been concluded that the application decreased the rate of retentio secundinarum and puerperal metritis cases, but had no effect on the rate of puerperal mastitis and post-partum oestrus.

**Keywords:** Heifer, Postpartum, Selenium, Vitamin E.

### Giriş

Son yıllarda yapılan çalışmalarda plasentanın atılmasının immünolojik olaylarla yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir. Gebelik sırasında plasentanın antioksidan kapasitesindeki azalma, retensiyon sekondinarumun etiolojisinde rol oynayabilir (Beagley ve ark., 2010). E vitamini ve selenyum plaseenta bağlantılarında kemotaksis ve lökosit sayılarını artırarak yavru zarlarının normal atılımına yardım ettiği, dokuları oksidatif hasardan korudukları belirtilmektedir. Vitamin E, nötrofillerdeki ürokinaz plazminojen reseptör

bağlayıcılarını artırarak, kemotaksisi hızlandırır. Retensiyon şekillenen ineklerde maternal ve fetal dokularda glutatyon peroksidaz aktivitesi, retensiyon şekillenmemiş ineklerden daha düşüktür (Spears ve ark., 2008).

Patojenler meme dokusuna saldırdığında serbest radikaller oluşur. Oluşan bu radikaller fagosite edilmiş mikroorganizmaları öldürmede kullanılır. Fakat belirli düzeyin üzerinde oluşurlarsa veya vitamin E gibi antioksidanlar yetersiz olursa organizmanın yapı elemanı olan lipid, protein,

karbonhidrat, nükleik asit ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Smith ve ark., 1997).

Enfeksiyon ve doku yıkımlanmalarında, yangı reaksiyonu ve hipoksi gibi durumlarda, dokularda lipid peroksidasyonu ve serbest radikaller artmaktadır. Nötrofillerin aktivite değişikliği sonucu endotel hücrelerde meydana gelen yangıya karşı E vitamini bu hücreleri korurken, aynı zamanda eritrositleri de hemolizden ve oksidatif hasardan muhafaza eder (Spears ve ark., 2008).

Vitamin E ve Se'nin; ovaryumlarda serbest radikallerin üretimini düzenlediği, selenyum enjeksiyonu yapılan hayvanlarda ovaryum kistlerinin %47'den 19'a düştüğü ve vitamin E'nin FSH, ACTH ve LH salınımını desteklediği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. (Barnes ve Smith, 1975; Harrison ve ark., 1984). Ayrıca vitamin E'nin steroidojenik enzimleri oksidatif hasardan koruduğu (Staats ve ark., 1988) ve günlük 1000 IU vitamin E takviyesinin ineklerde doğum sonrası ilk östrüs gösterme süresini kısalttığı (Campbell ve Miller, 1998) bildirilmiştir.

Sunulan bu bilgiler ışığında bu çalışmada, ülkemize ithal edilen ortalama 4-5 aylık gebe damızlık holstein düvelerde, doğumlarına yaklaşık 10 gün kala uygulanan vitamin E ve Se ile retensiyon sekondinarum, metritis, mastitis, ve ovaryum aktivitesinin tekrar başlaması arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışma için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan gerekli izinler alındı (Karar no: 2012/009). Çalışma materyalini, İzmir ilinde özel bir damızlık süt sığırı işletmesinde bulunan 22-26 aylık yaşta, 104 damızlık holstein ırkı düve oluşturdu. Düveler 2 gruba ayrıldı. Uygulama grubu hayvanlara (Grup 1, n=52), beklenen doğum tarihinden 10 gün önce Vitamin E ve Se içeren preparat (ml çözeltide 100 mg vitamin E asetata eşdeğer 100 IU Vitamin E, 1.03 mg saf selenyuma eşdeğer 3.0 mg Sodyum selenit 5 H<sub>2</sub>O, Seleject, Bremer Pharma GmbH) 15 ml intramuskuler olarak enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara (Grup 2, n=52) ise 5 ml izotonik NaCl enjekte edildi.

Çalışmadaki bütün hayvanlara uygun ve bir örnek beslenme ve barınma koşulları sağlandı. Düveler beton zeminli yarı açık ahırlarda barındırılmakta idi. Bu ahırlar serbest duraklı, boyundan kilitlemeli, kauçuk yataklı, her hayvana 1 yatak bulunacak şekilde tasarlanmıştı. İşletmede 2x10 balık kılçığı sistemde günde 2 sağım yapıyordu. Doğumuna iki hafta kalmış düveler doğum locasına alınarak deneyimli çiftlik personeli

ve veteriner hekim tarafından devamlı gözlemlendi. Postpartum ilk iki hafta boyunca, inekler günlük olarak boyunlarından kilitlendikten sonra, iştahları ve rektal vücut ısıları kontrol edildi. İştahsız veya rektal vücut ısı 39.5 °C'den yüksek olan inekler, çiftliğin teşhis protokolleri uyarınca metritis ve mastitis yönünden muayene edildi. Östrüs tespiti, sabah sağım sırası, akşam sağımı sırası ve gece 22:00 civarı olmak üzere günde 3 kez 30'ar dakika yapılan gözlem yönteminde çara akıntısı ve vulvada kızarıklık; ayrıca rektal muayenede ovaryum üzerinde graaf follikülü araştırılarak yapıldı. Doğumu izleyen 12 saat içinde yavru zararlarını atmayan hayvanlar retensiyon sekondinarumlu olarak değerlendirildi (Beagley ve ark., 2010). Klinik mastitis tanısı, sabah ve akşam sağımalarında inspeksiyon (meme lobları arasındaki farklılıklar), palpasyon (yangı, sertlik) ve strip kap ile sütün fiziksel muayenesi yapılarak sütte pıhtı, flakon veya renk değişikliği görülmesi ile yapıldı. Doğumu izleyen ilk 21 gün içerisinde kırmızı-kahverengi, pis kokulu, sulu, içerisinde nekrotik döküntüler bulunan büyük miktardaki uterus içeriği ile involüsyondaki gecikme nedeniyle anormal şekilde genişlemiş ince duvarlı bir uterus, purulent vaginal akıntı, ateş ( $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ ), iştahsızlık, durgunluk, süt veriminde düşme gibi sistemik hastalık belirtileri gösteren hayvanlar klinik metritisli olarak değerlendirildi (Sheldon ve ark. 2009).

Grupların istatistiki karşılaştırılmasında Pearson Chi-Square testi kullanıldı. Sonuçlar frekans (n) ve yüzde (%) olarak gösterilerek tablo ve grafiklerle özetlendi ve  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Çalışma sonucunda tespit edilen, retensiyon sekondinarum, metritis, mastitis ve östrüs görülme oranları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Uygulama grubu düvelerin 3'ünde (%5.8) retensiyon sekondinarum tespit edilirken, kontrol grubunda ise 10 düvede (%19.2) retensiyon sekondinarum tespit edildi. Gruplar arasındaki farkın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi ( $p=0.038$ ). Metritis oranları ise uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla %23.1 (n=12) ve %42.3 (n=22) olarak bulundu. Gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulundu ( $p=0.037$ ). Doğum sonrası mastitis gösterenlerin sayısı uygulama grubunda 12 (%23.1) iken kontrol grubunda bu sayı 7 (%13,5) olarak belirlendi. Postpartum 45 gün içinde östrüs gösteren düvelerin sayısı da uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla 17 (%32.7) ve 18 (%34.6) olarak tespit edildi. Doğum sonrası 45 gün içinde östrüs gösterme ve klinik mastitis görülme oranları açısından istatistiki fark önemsiz bulundu ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 1. Uygulama ve kontrol grubu düvelerde retensiyon sekondinarum, metritis, mastitis ve östrüs görülme oranlarının dağılımı.**

		GRUP				Total		P
		Deneme Grubu		Kontrol Grubu		N	%	
		N	%	n	%			
RETENSİYON SEKONDİNARUM	Var	3	5,8	10	19,2	13	12,5	0,038
	Yok	49	94,2	42	80,8	91	87,5	
METRİTİS	Var	12	23,1	22	42,3	34	32,7	0,037
	Yok	40	76,9	30	57,7	70	67,3	
MASTİTİS	Var	12	23,1	7	13,5	19	18,3	0,205
	Yok	40	76,9	45	86,5	85	81,7	
ÖSTRÜS	Var	17	32,7	18	34,6	35	33,7	0,836
	Yok	35	67,3	34	65,4	69	66,3	
<b>Toplam</b>		<b>52</b>	<b>50,0</b>	<b>52</b>	<b>50,0</b>	<b>104</b>	<b>100,0</b>	

### Tartışma ve Sonuç

Prepartum dönemde uygulanan vitamin E ve Se'nin, postpartum dönemde birçok ekonomik kayıplara sebep olan retensiyon sekondinarum, metritis, mastitis ve postpartum ilk östrüs görülme oranı üzerine olumlu bir etkisinin olup olmadığı yönünde birçok araştırma yapılmıştır. Arechiga ve ark. (1994) 198 sığira vitamin E ve Se uygulaması, retensiyon sekondinarum görülme oranı açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Gwazdauskas ve ark. (1979) 351 inek üzerinde yaptıkları çalışmada tek enjeksiyon vitamin E- Se'nin retensiyon sekondinarum üzerine hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Erskine ve ark. (1997) tahmini buzağılama tarihine yaklaşık 2 hafta kalan ineklere 3000 IU vitamin E uygulamasının retensiyon sekondinarum oranını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Benzer olarak prepartum vitamin E ve Se takviyesinin postpartum dönemdeki retensiyon sekondinarum insidensini önemli ölçüde azalttığını bildirilmiştir (Harrison ve ark., 1984; Kim ve ark., 1996; Sattar ve ark., 2007). Moeini ve ark. (2009) gebeliğin son dönemindeki 60 düveyi 3 gruba ayırıp kontrol grubuna 0 ml, I. gruba 20 ml ve II. gruba 40 ml selenyum + vitamin E enjekte etmişlerdir. Retensiyon sekondinarum görülme oranı kontrol grubunda 3/20 iken, I ve II. grupta retensiyon sekondinarum görülmemiştir. Bu çalışmada ise; uygulama grubundaki retensiyon sekondinarum oranı %5.8 iken kontrol grubunda bu oran %19.2 olarak

bulunmuş ve bu farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bulunan bu sonuçlar; birçok araştırmacının (Erskine ve ark., 1997; Harrison ve ark., 1984; Kim ve ark., 1996; Moeini ve ark., 2009; Sattar ve ark., 2007) sonuçlarına benzerlik gösterirken, Arechiga ve ark. (1994) ile Gwazdauskas ve ark. (1979) çalışmalarının sonuçlarından farklı bulunmuştur.

Erskine ve ark. (1997) 420 hayvan üzerinde yaptıkları çalışmada prepartum vitamin E uygulamasının, postpartum klinik metritis görülme oranlarına istatistiki olarak önemli etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Harrison ve ark. (1986) prepartum Se enjeksiyonu ve oral vitamin E takviyesinin metritis üzerine etkisini de araştırdıkları çalışmada, insidensin kontrol grubunda %84, Se grubunda %60 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında da; metritis oranları, uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla %23.1 (12/52) ve %42.3 (22/52) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki bu fark istatistiki olarak önemli bulunmuş ( $p=0.037$ ) ve Erskine ve ark. (1997) ile Harrison ve arkadaşlarının (1984) çalışmalarının sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Pavlatı ve ark. (2004) prepartum çift doz vitamin E ve Se uygulamasının postpartum 30 günlük periyotta, tek doz uygulanan gruba göre mastitis görülme oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Weiss ve ark. (1997) vitamin E'nin 3 farklı dozda uygulanmasının etkisini incelemişler ve sonuç olarak 1000 IU/gün kuru dönemin ilk 46

gününde, 4000 IU/gün kuru dönemin son 14 gününde ve 2000 IU/gün vitamin E laktasyon boyunca uygulanan grupta mastitis insidensinin önemli ölçüde düşük olduğunu bildirmişlerdir. Qureshi ve ark. (2009) gebeliğin son bir ayında uygulanan vitamin E ve Se'nin klinik mastitis insidensine hiçbir etkisinin olmadığı, aynı şekilde Erskine ve ark. (1997) 420 hayvan üzerinde yaptıkları çalışmada, prepartum uygulanan 3000 IU vitamin E'nin uygulama ve kontrol grupları arasında mastitis görülme insidensine hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, doğum sonrası mastitis gösterenlerin sayısı uygulama grubunda 12 (%23.1), kontrol grubunda bu sayı 7 (13,5) olarak belirlendi. Doğum sonrası klinik mastitis görülme oranları açısından iki grup arasındaki bu farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edildi.

Bu konuda farklı sonuçların elde edilmesinin sebepleri araştırmada kullanılan hayvanların bireysel metabolizma farklılığı ve uygulanan vitamin E-Se uygulama miktarı, zamanı ve uygulama süresinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca iklim, ahır ve sağım hijyeni, besleme-barındırma koşulları arasındaki muhtemel farklılıkların çalışma sonuçlarına etki edebileceği gerçeği göz ardı edilmemelidir.

Kim ve ark. (1996) 120 inek üzerinde yaptıkları çalışmada doğumuna 20 gün kala Se ya da vitamin E uygulamasının, tek başına gebelik başına tohumlama sayısı, gebelik oranı, östrüs oranı üzerine hiçbir etkisinin olmadığını fakat vitamin E ve Se'nin birlikte uygulanmasının postpartum ilk tohumlama süresini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Arechiga ve ark. (1994) rastgele seçilmiş toplam 198 sığira doğumdan 3 hafta önce, tek doz vitamin E ve Se içeren preparat enjekte etmişler ve uygulamanın, buzağılamadan ilk östrüse kadar geçen süreye hiçbir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Qureshi ve ark. (2009) gebeliğin son 1 ayında uygulanan vitamin E ve selenyumun sütçü buffalolardaki reproduktif performans üzerine etkisini araştırmışlardır. Reproduktif performans verileri göstermiştir ki vitamin E-Se uygulaması, östrüs oranını (%90-%55) önemli oranda artırmıştır. Barnes ve Smith (1975) vitamin E'nin FSH, ACTH ve LH salınımını desteklediğini öne sürmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada postpartum 45 gün içinde östrüs gösteren düvelerin oranı uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla %32.7 (17/52) ve %34.6 (18/52) olarak tespit edildi. Doğum sonrası östrüs belirtilerinin görülme oranları arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Farklı sonuçların elde edilmesi sunulan çalışmada materyal olarak kullanılan hayvanların düve olması, bilgisayar destekli östrüs takip sistemi eksikliği sebebiyle, östrüs takibinin gözlem yolu ile yapılması ve bu

sebeple de bazı östrüslerin gözden kaçmış olabileceği, bakım ve besleme koşullarındaki farklılıkların etkisi ile açıklanabilir.

Bu çalışmada ülkemize ithal edilen 4-6 aylık gebe düvelerde tahmini buzağılamaya 10 gün kala uygulanan ve önemli antioksidanlar olan vitamin E ve Se'nin özellikle retensiyo sekundinarum ve klinik metritisin görülme sıklığını azaltabileceği sonucuna varıldı. Vitamin E ve Se ölçümlerinin hem kanda hem de rasyonda yapıldığı ayrıca materyal sayısının daha yüksek olduğu yeni çalışmalar, sonuçların desteklenmesi açısından faydalı olacaktır.

## Kaynaklar

- Arechiga CF, Ordz O, Hansen PJ, 1994: Effect of Prepartum Injection Of Vitamin E and Selenium on Postpartum Reproductive Function of Dairy Cattle. *Theriogenology*, 41, 1251-1258.
- Barnes MMC, Smith AJ, 1975: The effects of vitamin E deficiency on some enzymes of steroid hormone biosynthesis. *Int J Vitam Nutr Res*, 45, 396-403.
- Beagley JC, Whitman KJ, Baptiste KE, Scherzer J, 2010: Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *J. Vet Intern Med*, 24(2), 261-268.
- Campbell MH, Miller JK, 1998: Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron. *J Dairy Sci*, 81(10), 2693-2699.
- Erskine RJ, Bartlett PC, Herdt T, Gaston P, 1997: Effects of parenteral administration of vitamin E on health of periparturient dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 211(4), 466-469.
- Gwazdauskas FC, Bibb TL, Mcgilliard ML, Lineweaver JA, 1979: Effect of prepartum selenium-vitamin E injection on time for placenta to pass and on productive functions. *J Dairy Sci*, 62, 6.
- Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR, 1984: Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci*, 67, 123-132.
- Harrison JH, Hancock DD, St. Pierre N, Conrad HR, Harvey WR, 1986: Effect of prepartum selenium treatment on uterine involution in the dairy cow. *J Dairy Sci*, 69, 1421-1425.
- Kim HS, Lee JM, Park SB, Jeong JK, 1996: Effect of vitamin E and selenium administration on the reproductive performance in dairy cows. *Ajas*, 10(3), 308-312.
- Moeini MM, Karami H, Mikaeili E, 2009: Effect of selenium and vitamin E supplementation during the late pregnancy on reproductive indices and milk production in heifers, *Anim Reprod Sci*, 114, 109-114.
- Pavlatı L, Prasek J, Filipek J, Pechova A, 2004: Influence of parenteral administration of selenium and vitamin E during pregnancy on selected metabolic parameters and colostrum quality in dairy cows at parturition. *Vet. Med.- Czech*, 49(5), 149-155.
- Qureshi ZI, Siddiq M, Lodhi LA, Muhammad G, Jamil H, 2009: Effect of vitamin E-selenium administration during late gestation on productive and



- reproductive performance in dairy buffaloes and on growth performance of their calves. *Pak Vet J*, 30(2), 83-86.
- Sattar A, Mirzai RH, Hussain MI, 2007: Effect of prepartum treatment of vitamin E-selenium on postpartum reproductive and productive performance of exotic cows and their calves under subtropical conditions. *Pak Vet J*, 27(3), 105-108.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schubert HJ, 2009: Defining postpartum uterine disease and mechanisms of infection and its in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, 81, 1025-1032.
- Smith KL, Harrison JH, Hancock DD, Todhunter DA, Conrad HR, 1984: Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J Dairy Sci*, 6, 1293-1300.
- Smith KL, Weiss WP, Hogan JS, 1997: Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci*, 80, 1728-1737.
- Spears JW, Weiss WP, 2008: Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J*, 176(1), 70-76.
- Staats DA, Lohr DP, Colby HD, 1998: Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology*, 123, 975-980.
- Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL, 1997: Effect of vitamin e supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J Dairy Sci*, 80(8), 1728-1737.
- \*"Sığırlarda gebeliğin son döneminde uygulanan vitamin E ve Selenyumun postpartum dönem sorunları üzerine etkisi" adlı yüksek lisans tezinden özetlenmiş, herhangi bir kurum ya da kuruluştan destek alınmamıştır.
- \*\*Yazışma Adresi:** Hayrettin ÇETİN  
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Işıklı, Efeler-AYDIN  
**e-mail:**unalyavuz@harran.edu.tr

## Deneysel Diyabetik Nefropatide Patomorfoloji ve Apoptozis

Nihat YUMUŞAK<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9299-2902

Geliş Tarihi: 08.02.2020

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Özet:** Bu çalışmada diyabetik nefropatiye bağlı oluşan böbrek hasarında histopatolojik ve apoptotik bulguların değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada 16 rat rastgele olarak kontrol (n=8) ve üç gün arayla iki kez streptozotocin (60 mg/kg, i.p) uyarılmış diyabet (n=8) olmak üzere iki gruba ayrıldılar. Son uygulamayı takip eden 90. günde ratlar uyutularak böbrekleri patolojik incelemeler amacıyla alındı. Dokulara histopatolojik olarak hematoksilin-eozin ve immunohistokimyasal olarak kaspas-3, kaspas-8, kaspas-9 ve TUNEL işaretlemeleri yapıldı. Histopatolojik olarak, tubullerde dilatasyon, atrofi, dejenerasyon, nekroz, glomeruluslarda ise hipertrofi ve vasküler değişiklikler görüldü. İntersitisyel alanlarda ise yer yer peritubuler, perivasküler ve periglomeruler fibrozis ve inflamasyonlar gözlemlendi. İmmunohistokimyasal olarak, kaspas-3'ün birçok tubulde pozitif olduğu ayrıca glomerullerde ve intersitisyumda tek tük pozitif hücre ile karşılaşıldı. Kaspas-8 ve kaspas-9 antikörlerinin ise birçok tubulde reaktif oldukları belirlendi. TUNEL boyamalarında ise yaygın pozitiflik tubulde, yer yer intersitisyumda ve glomeruluslarda belirlenmiştir. Sonuç olarak, diyabete bağlı oluşan nefropatide bütün böbrek dokusunda hasarın şekillendiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik nefropati, Patomorfoloji, Apoptozis.

### Pathomorphology and Apoptosis in Experimental Diabetic Nephropathy

**Abstract:** The aim of this study was evaluated by histopathological and apoptical of kidney damage in rats with streptozotocin induced diabetes. Sixteen rats were randomly divided into two groups as a control group (n=8) and rats with twice dose (streptozotocin, 60 mg/kg, i.p.) of the diabetic group. At the end of the last given of streptozotocin 90. days, the rats were sacrificed and the kidneys were removed for histopathological and immunohistochemical examination. For histological analysis tissue sections were stained with hematoxylin-eosin, for the immunohistochemical studies sections were stained with caspase-3, caspase-8, caspase-9 and TUNEL assay method. Histopathologically, the kidney in the diabetic group showed glomerular sclerosis, thickening, and membrane hyalinization, tubular atrophy, tubular dilatation, cellular vacuolization, and reabsorption droplets in tubule lumens. In the interstitium inflammation, and fibrosis also were seen. Immunohistochemically, increased caspase-3 immunoreactivity in the tubular epithelial cells and few glomerular and interstitial cells. Caspase-8 and caspase-9 were reactive in tubules. In general, diffuse immunoreactivity in tubules, glomerules and interstitium were observed in TUNEL staining. These results indicate that all component in the kidneys of diabetic rats were damaged.

**Keywords:** Diabetic nephropathy, Patomorphology, Apoptosis.

### Giriş

Diyabetes mellitus (DM), yeterli insülin salgılanamaması veya salgılanan insülinin etkisiz kalması sonucu oluşan, hiperglisemi ile seyreden karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalara neden olan kronik seyirli bir hastalıktır (Jones ve ark., 2013; Njolstad ve ark., 2003; Strippoli ve ark., 2003). Dünya Sağlık Teşkilatı (2006) verilerine göre gün geçtikçe gerek ülkemizde gerekse dünyada DM insidensinde artışın olduğu görülmektedir. DM doğrudan birçok klinik semptomu neden olurken hastalığa bağlı oluşan komplikasyonlar ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Hastalarda retinopati, dermatitis, nöral, kardivasküler ve böbrek bozuklukları en yaygın görülen komplikasyonlardır (Krolewski ve ark., 1996; Nadir ve ark., 2003). Diyabetli hastaların %44'ünde görülen ve klinik bir bulgu olarak kabul

edilen diyabetik nefropatinin (DN) ilk evrelerinde belirgin bir bulgunun görülmemesi çoğu hasta tarafından göz ardı edilir. Böbrek fonksiyonlarına ait klinik semptomların başladığı ve histopatolojik hasarın şekillendiği kronik dönem ise son dönem böbrek yetersizliği olarak tanımlanır ve hasta dialize bağımlı olur. Bu nedenle DM hastalarında yüksek tedavi giderlerine ve mortalite neden olmaktadır (Fiorina ve ark., 2005; Jones ve ark., 2013; Parving ve ark., 1996).

DN oluşumunda birçok faktör rol alırken, genetik bozukluk, yüksek glikoz düzeyi, renin-angiotensin sistem, glomeruler hiperfiltrasyon ve serbest oksijen radikalleri önemli etmenler arasında yer alır (Friedman, 1996). DM'sa bağlı oluşan hiperglisemi ve glukoz toksikasyonu da başlıca nefropatinin patogenezinde rol alır. Kronik

hiperglisemi arteriyel endotelde yangısal medyatörlerin ve nitrik oksit salınımının artırılmasına neden olarak glomerulosklozisin oluşumuna sebep olur (Krolewski ve ark., 1996; Van Dijk ve Beri, 2004). Bununla birlikte tek başına hiperglisemi nefropatinin oluşumu için yeterli değildir. Glukoz birikimi de benzer reaksiyonlara neden olurken artan glukoz hücrelerde proliferasyonlara, hücre dışı matriksin ve TGF- $\beta$ 'nın artışına neden olarak hücreleri etkiler. Aşırı glukoz hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi antioksidantların azalmasına bu da dokuda serbest radikallerin artışına neden olur (Nadir ve ark., 2003; Van Dijk ve Beri, 2004; Wang ve Chahners, 1993). Artan serbest oksijen radikalleri ise damar endotelinde hasarın şekillenmesine neden olur. Sonuçta hücrede Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP'az aktivitesi azalarak hücre içinde sodyum birikir. Buna bağlı olarak hücrede ödem ve fonksiyon bozukluğu şekillenir. Bu değişiklikler dokularda inflamasyona ve nekroza neden olurken hücrelerde apoptozisi tetikler (Duran-Salgado ve Rubio-Guerra, 2014). DN'de akut dönemdeki histopatolojik bulgular hastalığın tanısında belirleyici değildir. Patognomik histolojik bulgular daha çok kronik dönemde özellikle vasküler yapısında bozulması ile birlikte oluşur (Estacio ve ark., 2000; Fioretto ve ark., 2000). Histopatolojik bulgular daha çok glomeruler yapıda şekillenmesine rağmen, intersitisyel, tubuler ve vasküler yapısında etkilendiği bildirilmektedir (Mauer ve ark., 1990; Phillips ve Steadman, 2002; Wolf, 2004).

Bu çalışma ile, diyabetik nefropatide görülen patomorfolojik değişikliklerin ve apoptozisin belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Deney protokolü

Çalışmada 200-250 g ağırlıklarında ve 5-6 haftalık yaşlarda 16 Wistar albino türü erkek rat kullanıldı. Çalışmadan bir hafta önce ratların laboratuvar koşullarına uyumu sağlandı. Hayvanlar oda sıcaklığının 21±2 °C ve nemin %65-70 olduğu 12 saat aydınlık/karanlık siklusların sağlandığı ortamda polypropilen kafeslerde tutuldu. Standart serbest yemleme ve su ile beslendi. Yapılan deneysel çalışmalar deney hayvanları ünitesinde deney hayvanları etik kurul onayı ve gözetimi altında yapıldı (Onay No: 2017/03).

Çalışma öncesi ratlar rastgele olarak; herhangi bir işlem uygulanmayan Grup I (Kontrol grubu (n=8)) ve 3 gün aralıklarla iki kez intraperitonel olarak streptozotocin (STZ, 60 mg/kg, Sigma, MO, USA; 0.05 M citrate buffer; pH 4.5) uygulanan Grup II (diyabetik grup (n=8)) olmak üzere ikiye ayrıldılar. STZ uygulamayı takip eden 48. saatlerde kan glukoz

ölçümü (GlucDr SuperSensor™ Blood Glucose Monitoring System, AGM-2200, All Medicus Co., Ltd., Republic of Korea) yapıldı. Ölçümlerde 16.7 mmol/L tespit edilen ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Son STZ uygulamasını takip eden 90. günde ratlar uyutuldu ardından uygun yöntemlerle böbrek dokuları alınarak histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler amacıyla %10 tamponlu nötral formalinde tespit edildi.

### Histopatolojik çalışmalar

Tespit edilen doku örneklerinden formalini uzaklaştırmak amacıyla dokular akarsuda bir gece yıkandı. Ardında rutin patolojik doku takibine alınarak dereceli alkol (%50, %75, %96, %100) ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan 5  $\mu$  kalınlığında kesitler Leica RM 2125 RT ile ilk üç kesit ve her onuncu kesitler lamlara alındı. Hazırlanan preparatlar alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek hematoksilin eozin (HE) boyaması ile boyandı. Tüm örnekler yüksek çözünürlüklü ışık mikroskopunda (Olympus DP-73 camera, Olympus BX53-DIC microscope; Tokyo, Japan) X40-X100-objektif büyütmelerinde incelendi.

### İmmunohistokimyasal çalışmalar

İmmunohistokimyasal boyamalar primer antikörlerin protokolü doğrultusunda streptavidin-biotin-peroksidaz (ABC) yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla daha önce hazırlanan parafin bloklardan 5  $\mu$  kalınlığında kesitler lysinli lama alınarak alkol ve ksilol ile deparafinize ve dehidre edildi. Dokulardaki antijenin geri kazanımı için kesitler mikrodalga fırında 700W'da 20 dakika pH 6.0 Sitrate buffer ile muamele edildi. Ardından peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla 15 dakika oda sıcaklığında %0.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de nemli kamarada bekletildi. Primer antikordan önce 20 dakika oda sıcaklığında %5'lik normal keçi serumunda protein baskılaması yapıldı. Daha sonra kesitler Caspase-3 (1:200, Invitrogen, PA5-16335), Caspase-8 (1:50, Abcam, ab4052) and Caspase-9 (1:100, Abcam, ab52298) primer antikoru damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. PBS (Phosphate buffered saline) ile yıkanan kesitler 30 dakika sekonder antikorda bekletildikten sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla kromojen olarak diaminobenzidine (DAB, Lab Vision)'de 3 dakika bekletildi. Zemin boyaması için ise Harris Hematoksilin kullanıldı. Son olarak alkol ve ksilolden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı.

### TUNEL boyama

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferasemediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling) işaretlemeleri üretici firma katalog prosedürüne (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche, Germany) göre yapıldı. Bu amaçla

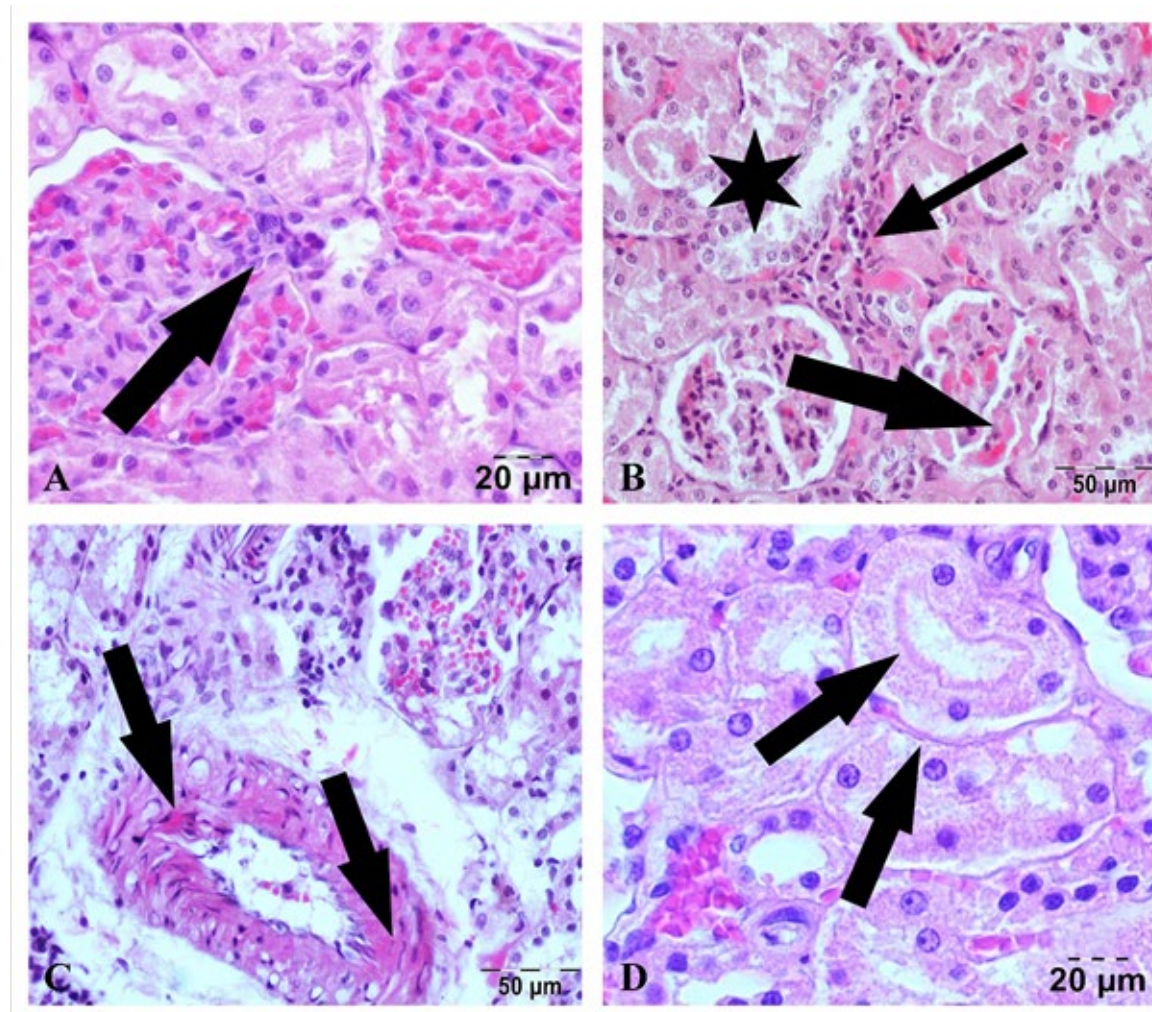
parafin bloklardan 5 µ kalınlığında kesitler lysinli lama alındı, alkol ve ksilol ile deparafinize ve dehidre edildi. Ardından peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla kesitler 15 dakika oda sıcaklığında % 0.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler Protein K (20 mg/ml; Roche, Mannheim, Germany) ile oda sıcaklığında ve nemli kamarada 15 dakika muamele edildi. Yıkanan kesitler daha sonra taze hazırlanan 50µl of TUNEL reaction mixture (TdT & dUTP) solüsyonunda karanlık ortamda 37 °C'de 1 saat bekletildi. Ardından kesitler 50 µl anti-fluorecein antikör konjugat POD enzim homojenatıyla kaplanarak 30 dakika 37 °C'de bekletildi. Son olarak yıkanan kesitler AEC (3-Amino

9-Ethyl Carbasole, Dako, Glostrup, Denmark) ile 10 dakika muamele edildikten sonra hematoksilen ile zemin boyaması yapılarak lamelle kapatıldı.

## Bulgular

### Histopatolojik bulgular

Histopatolojik olarak glomeruluslar, tubuluslar, intersitisyum ve damarlarda görülen patolojik parametreler değerlendirildi. Kontrol grubuna ait böbreklerde herhangi bir patolojik lezyonla karşılaşmadı. Buna karşın, diyabetik ratlara ait böbreklerde belirgin hasarın şekillendiği görüldü (Şekil 1). Glomeruluslardaki kapillarlarda belirgin

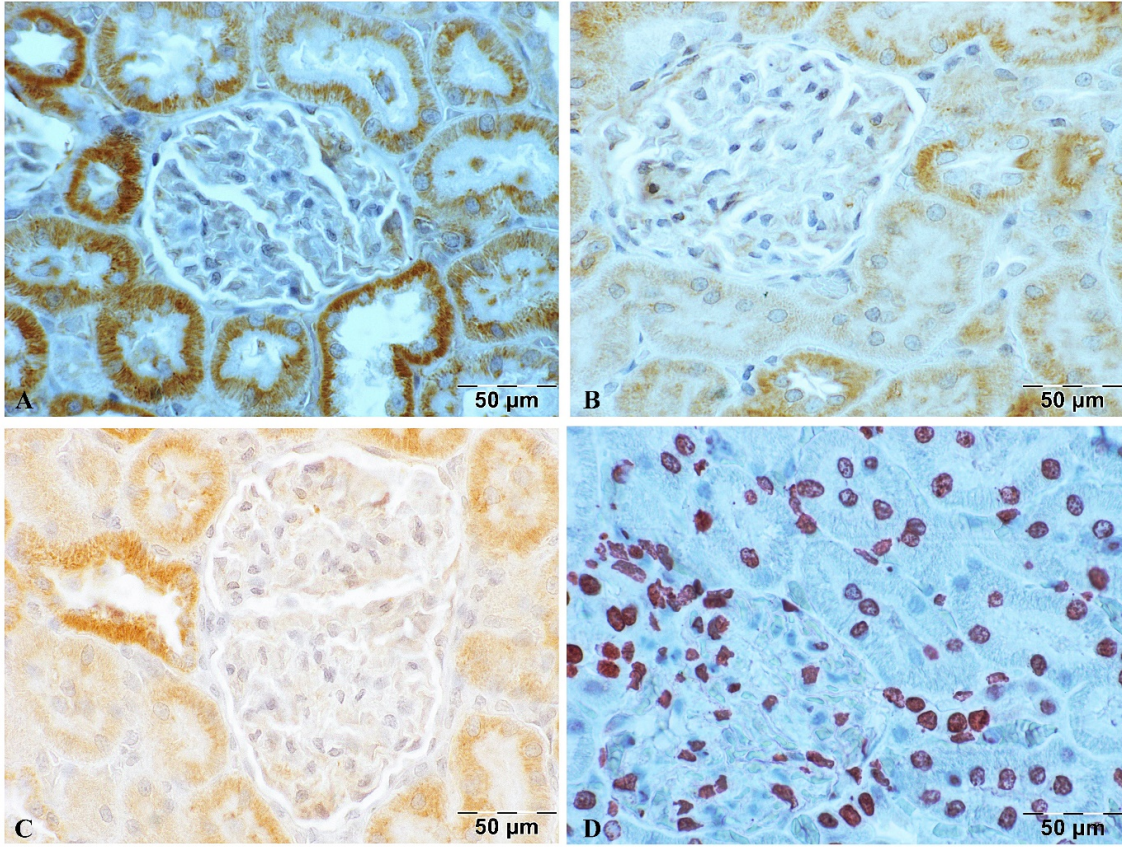


**Şekil 1.** Diyabetli ratlara ait böbrek dokusunun histopatolojik bulguları. **A)** Segmental proliferasyon (ok), HE. **B)** Glomeruler ve tubuler dejenerasyon (yıldız), glomeruler hiyalinizasyon (ok) ve peritubuler inflamasyon (ince ok), HE. **C)** Vasküler hiyalinizasyon (oklar), HE. **D)** Tubul membranlarında kalınlaşma (oklar), HE.

hiperemi ile mesengial hücre proliferasyonları belirlendi. Glomerular vasküler kalınlaşma ile kimi alanlarda sklerozis ile karşılaşıldı. Ayrıca bowman kapsülünde genişlemeler gözlemlendi. Kimi glomeruler yapıların atrofik olduğu yer yer çevrelerinde hücre infiltrasyonları belirlendi. Periglomerular

alanlarda fibrozis görüldü. Tubullerde ise, yaygın atrofi ile yer yer tubuler dilatasyonlar dikkati çekti. Kimi tubul lumenlerinde protein çökeltileri ile karşılaşıldı. Az sayıda alanda ise tubuler dejenerasyon ve nekrozis belirlendi. Tubul hücre sitoplazmalarında değişen şiddette vakuoller





**Şekil 2.** Diyabetli ratlara ait böbrek dokusunun immunohistokimyasal bulguları. **A)** Kaspas-3 yönünden tubuller birlikte intersitisyum hücrelerinde pozitif reaksiyon, DAB. **B)** Kaspas-8 pozitif tubulus ve glomeruluslar, DAB. **C)** Kaspas-9 ile pozitif tubul epitel hücreleri, DAB. **D)** Tubullerde yoğun TUNEL reaksiyonu, AEC

gözlemlendi. Epitel hücrelerde apoptotik mikronükleus yapıları dikkati çekti. Gerek proksimal ve gerekse distal tubullerin çevresinde fokal fibrozis belirlendi. Yer yer bu alanlarda inflamasyon görüldü. Vasküler yapılarda hiperemi ile birlikte intimal fibrozis ve perivasküler inflamasyonlar tespit edildi.

#### İmmunohistokimyasal bulgular

Apoptozisin belirlenmesi amacıyla immuno-histokimyasal yapılan kaspas-3, Kaspas-8, Kaspas-9 ve TUNEL boyamalarında; DN oluşturulmuş böbreklerde belirgin ve yaygın immunopozitiflik dikkati çekti (Şekil 2).

Özellikle Kaspas-3 antikoruna karşı tubul epitel hücrelerinin yoğun pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. Ayrıca kimi alanlarda intersitisyel dokuda az da olsa pozitif hücreler tespit edildi. Bazı vasküler endotelial hücrelerde de benzer reaksiyonlar gözlemlendi. Glomeruler yapıda ise tek tek immunopozitif hücreler görüldü. Kaspas-8 ve kaspas-9 ile yapılan boyamalarda ise özellikle proksimal tubullerde pozitif reaksiyonun yaygın olduğu bununla birlikte distal tubullerde de immunopozitiflik gözlemlendi. Yer yer glomeruluslarda ve intersitisyel dokusunda immunopozitif olduğu dikkati çekti. TUNEL

boyamasında dokunun hemen hemen her alandaki tubul epitelinin ve vasküler endotelial yaygın pozitif oldukları, bununla birlikte birçok glomerulusta ve intersitisyel hücrelerde de immunopozitif reaksiyonların olduğu görüldü.

#### Tartışma

DM karbonhidrat metabolizması bozukluğu sonucu şekillenen ve hiperglisemi ile seyreden, kronik seyirli bir metabolizma bozukluğu olup birçok organ ve dokuda hasara neden olur. Diyabetin dokulardaki hasarı temelde yangısal, metabolik ve vasküler yapıdaki değişikliklere bağlı olarak oluşur (Estacio ve ark., 2012; Krolewski ve ark., 1996; Ozougwu ve ark., 2013). Özellikle hemodinamik sebepler nedeniyle hastalarda önemli oranda mortaliteye neden olan diyabetik nefropati olarak bilinen kronik böbrek yetersizliği şekillenir. Oldukça sinsi seyreden böbrek bozukluğu genellikle proteinüri dışında klinik semptom göstermeden ilerleyerek son dönem böbrek yetersizliği ile sonuçlanır (Dereli ve ark., 1999; Locatelli ve ark., 2004; Warram ve ark., 2010).

Diyabetik nefropatinin etiopatogenezi henüz tam olarak açıklanmış olmasa da genel kanı

hiperglisemi ve glikotoksositeye bağlı dokularda artan sitokin, kemokin ve serbest radikaller gibi yangı tetikleyici faktörlerin artması ile oluşan mikrovasküler hasar sonucu şekillendiğidir (Krolewski ve ark., 1996; Warram ve ark., 1996). Serbest radikallerin artması ve sitokinlerin salgılanması damar endotelinde hasara neden olurken tromboz ve pıhtılaşmayı tetikler. Mikrovasküler yapıda meydana gelen bu hasar sonu böbrek dokusunda özellikle glomeruluslarda histopatolojik lezyonlar şekillenir (Sarnak ve ark., 2003; Tunçdemir ve ark., 2018; Wolf, 2004). Diyabetik nefropatide glomeruluslarda görülen bu patoloji hastalığın tanısında oldukça önemlidir (Mauer ve ark., 1990). Erken dönem glomeruler sklerozis en belirgin patolojik bulgu iken bowman kapsülündeki ve bazal membrandaki kalınlaşmalar ayrıca dikkati çeker. Bununla birlikte son dönem nefritis olarak kabul edilmesi nedeniyle böbrek biyopsisinde daha çok kronik bulgular ile karşılaşılır (Phillips ve Steadman, 2002; Tunçdemir ve Öztürk, 2008). Sıklıkla glomeruler hipertrofi ile birlikte tubulointersitsiyel dokudaki değişiklikler gözlemlenir. Glomeruler yapıdaki sklerozis noduler yapıya dönüşebilir. Glomeruler kapsülde kalınlaşmalar oldukça belirginleşir. Mezengial hücrelerdeki hipertrofi sonucu glomerulusların hacminde artış görülür (Fiorina ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2004; Tunçdemir ve ark., 2018; Phillips ve Steadman, 2002). Kimi olgularda ise vasküler hyalinizasyonlarla karşılaşılabilir. Arteriosklerozis interstisyel arterlerde ve glomeruler kapillerde gözlemlenebilir. Tubulointersitsiyel alanlarda ise belirgin fibrozis olgusu dikkati çeker. Tubuler bazal membranda kalınlaşmalar ile tubullerde dilatasyon ve atrofiler belirgindir. Bazı şiddetli ve kronik olgularda ise glomeruler ve tubuler yapıları kapsayan fokal nekroz alanları ile karşılaşılabilir (Kumar ve ark., 2004; Mauer ve ark., 1990; Phillips ve Steadman, 2002; Tunçdemir ve ark., 2018; Yaman ve Kömüroğlu, 2018). Hücrelerde artan glikojen hücre sitoplazmasında birikerek hücre hasarına ve sitoplazmik partiküllerin oluşmasına neden olur (Tunçdemir ve Öztürk, 2008). Yapılan bu çalışmadaki patomorfolojik bulgular literatür verileri ile benzer olduğu dikkati çekmektedir. Özellikle uzun dönem hiperglisemiye maruz bırakılan ratların glomeruler yapısındaki hasar belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Glomeruler hipertrofi ve bowman kapsülündeki kalınlaşmaların vasküler yapıda meydana gelen hasarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kimi glomeruler vasküler yapıda hyalinizasyonun varlığı belirlenmiştir. Ayrıca tubuler yapıda görülen atrofiler ve yer yer dilatasyonlarda literatür verileri ile örtüşmektedir. Bazı tubul epitel hücrelerinde görülen vakuollerle birlikte apoptotik çekirdeklerin glikojen birikimine bağlı oluşan

glikotoksikasyon sonucu şekillenmiş olabileceği kanısına varılmıştır. Çok olmasa da kimi tubullerde literatürde bahsedildiği gibi nekrozun şekillenmiş olduğu görüldü.

Kronik hiperglisemi ve glikoz toksikasyonuna maruz kalan dokulardaki kollajende, hücre içi proteinlerde ve DNA'da dönüşümsüz hasar oluşur. Diyabetik nefropatide oluşan vasküler iskemi ve artan serbest radikaller inflamasyona, apoptozise ve nekroze neden olur (Kumar ve ark., 2004; Ortiz ve ark., 1997; Tunçdemir ve ark., 2018; Zang ve ark., 1997). Farklı deneysel çalışmalarla oluşturulan böbrek hasarında kaspas yolaklarının rolünün olduğu bildirilmiştir. Tunçdemir ve ark. (2018) yaptıkları kapsamlı çalışmada, deneysel diyabetik ratların böbrek dokularında malondialdehit (MDA), ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) ve protein karbonil (PC) gibi oksidasyon belirteçlerinin artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca diyabetik ratların böbrek dokularını immunohistokimyasal olarak, apoptotik, antiapoptotik, kaspas-3 ve TUNEL yöntemleri ile incelemiş ve apoptozisi özellikle tubül hücrelerinde ve yer yer glomeruler yapıda tespit etmiştir. Ortiz ve ark. (1997) hiperglisemik vakalarda antiapoptotik belirteç olan Bcl-2'nin azalmasına, buna karşılık apoptozisin göstergesi olarak kabul edilen Bax proteininin arttığını belirlemişlerdir. Kumar ve ark. (2004) hem tubul hemde interstisyel dokuda apoptozisin varlığını DN'li hastalara ait biyopsi örneklerinde tespit etmişlerdir. Yine Zang ve ark. (1997) deneysel oluşturulan DN'li ratların böbreklerinde tubul epitel hücrelerinde apoptozisin varlığını immunohistokimyasal olarak belirlemişlerdir. Her üç çalışmada da apoptozisin tubul epitel hücrelerinde özellikle proksimal ve distal tubullerde şekillendiği, ayrıca interstisyel hücrelerde yer yer apoptotik hücrelerin varlığını ortaya konmuştur. Yaman ve Kömüroğlu (2018) kaspas-3 yönünden özellikle proksimal tubul epitelinde ve kimi glomeruler hücrelerde şiddetli pozitiflik tespit etmişlerdir. Tunçdemir ve Öztürk (2008) ise ratlarda deneysel oluşturdukları diyabetik nefropatide immunohistokimyasal olarak distal tubullerle birlikte medullar tubullerde de apoptozisin yoğun olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada glomeruler yapıda da az sayıdaki hücrede apoptozisin varlığını gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, immunohistokimyasal ve TUNEL yöntemi ile apoptozisin varlığı araştırıldı. Özellikle tubuler epitelde kaspas-3 reaksiyonunun belirgin şekilde pozitif olduğu dikkati çekti. Buna karşılık kaspas-8 ve kaspas-9'un fokal alanlar halinde tubuler immunopozitif oldukları görüldü. Kaspas pozitifliğinin literatürle paralel olarak distal ve medullar bölgelerde yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Kaspas-8 ve kaspas-9 pozitifliğinin tubuler yapılarda

görülmesine karşılık kaspas-3'ün az sayıda glomerulusta da pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Yine kaspas-3 antikoru karşı intersitisyel dokudaki kimi hücrelerinde yer yer zayıf pozitif oldukları belirlenmiştir. Ayrıca yapılan TUNEL işaretlemelerde çekirdek pozitifliğinin kaspas boyamalarına oranla daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu farklılığın apoptozis öncesi hücrelerde meydana gelen çekirdek kırılmalarının göstergesi olarak şekillendiği düşünülmektedir. TUNEL pozitifliği hemen hemen tubuler yapının tamamında görülürken glomeruler yapılarda da belirlenmiştir.

Sonuç olarak, diyabetik nefropatide şiddetli glomeruler hasar ile birlikte tubuler yapı ve interstisyel doku da etkilenmektedir. Vasküler değişiklikler ile birlikte fibrozis ve inflamasyon şekillenmektedir. Özellikle böbrek hasarında kaspas yollarının rolünün immunohistokimyasal olarak belirlenmiş olması ve TUNEL işaretlemelerinde çekirdek hasarının görülmesi böbreklerde ilerleyen ve geri dönüşsüz hasarın varlığını göstermektedir.

### Kaynaklar

- Dereli D, Özbal EY, Akyurt M, Günel Z, 1999: Diyabetik nefropati etyopatogenezine güncel bir bakış. *J SSK Tepecik Hosp Turkey*, 9(2-3): 66-71.
- Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF, 2014: Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes*, 5(3): 393-398.
- Estacio RO, Jeffers BW, Gifford N, Schrier RW, 2000: Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 23, 54-64.
- Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M, 1998: Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*, 339: 69-75.
- Fioretto P, Vestra MD, Saller A, Mauer M, 2000: Renal structure in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. In: Mogensen CE (ed). *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus*. 5th ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 225-236.
- Fiorina P, Venturini M, Folli F, Losio C, Maffi P, et al. 2005: Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation. *Diabetes Care*, 28 (6): 1303-1310.
- Friedman EA, 1996: Renal syndromes in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25: 293-24.
- Jones RK, Hamton D, O'Sullivan DJ, et al. 2013: Diabetes and renal disease. *Clin Med*, 13:460-464.
- Krolewski AS, Warram JH, Freire MB, 1996: Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25:217-242.
- Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD, 2004: Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol*, 96: 77-88.
- Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L, 2004: Renal replacement therapy in patients with diabetes and end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 1: 25-29.
- Mauer SM, Chavers BM, Steffes MW, 1990: Should there be expanded role for kidney biopsy in the management of patients with Type 1 diabetes? *Am J Kidney Dis*, 16: 96-100.
- Nadir I, Topçu S, İçağasıoğlu S, Nilüfer Yıldırım N, 2003: Tip II Diabetes Mellitusta Nefropati Gelişiminde Risk Faktörleri. *Van Tıp Dergisi*: 10(3):65-68
- Njolstad PR, Sagen JV, Bjorkhaug L, Odili S, Shehadeh N, Bakry D, Sarici SU, Alpay F, Molnes J, Molven A, Sovik O, Matschinsky FM, (2003). Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes*, 52(11): 2854-60.
- Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG, 1997: Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Investig Med*, 45: 50-56.
- Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB, (2013): The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol*, 4(4): 46-57.
- Parving HH, Ostorby R, Anderson PW, Hsuoh WA, 1996: Diabetic nephropathy. In: Brenner BM (ed). *The Kidney*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1864-1892.
- Phillips AO, Steadman R, 2002: Diabetic nephropathy: The central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury. *Histol Histopathol*, 17: 247-252.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. 2003: American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease. *Hypertension*, 42: 1050-1065.
- Strippoli GF, Di Paolo S, Cincione R, et al. 2003: Clinical and therapeutic aspects of diabetic nephropathy. *J Nephrol*, 16: 487-499.
- Tunçdemir M, Ozturk M, 2008: The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Histol*, 39: 605-616.
- Tunçdemir M, Mirzataş EB, Uzun H, 2018: Renoprotective potential of quercetin in experimental diabetic nephropathy: assesing antiapoptotic and antioxidant effects. *Arch Clin Exp Med*, 3(3):179-185.
- Van Dijk C, Beri T, 2004: Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord*, 5: 237-248.
- Wang PH, Chahners TC, 1993: Metaanalysis of effects of intensive blood-glucose control on the late complications of type 1 diabetes. *Lancet*, 341: 1306-1309.



Warram JH, Gearin G, Laffel L, Krolewski AS, 1996: Effect of duration of Type 1 diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol*, 7: 930-937.

Warram JH, Scott LJ, Hana LS, et al. 2000: Progression of microalbuminuria to proteinuria in Type 1 diabetes: Non linear relationship with hyperglycemia. *Diabetes*, 49: 94-100.

Wolf G, 2004: New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*, 34: 785-796.

World Health Organization, 2016: Global Report on Diabetes. Geneva: World Health Organization.

Yaman Y, Kömüroğlu AU, 2018: Deneysel Diyabetik Ratlarda Ardiç (*Juniperus communis* L.) Yağının Nefropati Üzerine Etkileri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 7(2): 192-199.

Zhang G, Khanna P, Chan LL, et al. 1997: Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem Mol Med*, 61:58-62.

**\*Yazışma Adresi:** Nihat YUMUŞAK  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Eyyübiye  
Kampüsü, Şanlıurfa, Türkiye.  
**e-mail:** nihatyumusak@harran.edu.tr

## Sığır Brusellozunun Teşhisi İçin Sütte İndirekt ELISA'nın Kullanımının Değerlendirilmesi\*

İbrahim Çadircı<sup>1,a</sup>, Sevil Erdenliğ Gürbilek<sup>2,b,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Tarım Orman İl Müdürlüğü, Gıda ve Yem Şubesi, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0930-5076, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-0377-2650

Geliş Tarihi: 12.02.2020

Kabul Tarihi: 08.06.2020

**Özet:** Bu çalışmada sütte anti *Brucella* antikorlarını saptamak için bir indirekt süt ELISA prototipi geliştirilmesi amaçlandı. Daha önce *Brucella abortus* biyotip 3 izole edilen enfekte çiftliklerden alınarak Rose Bengal Pleyt testi (RBPT) ve komplement fiksasyon testi (KFT) ile test edilerek pozitif bulunan toplam 36 süt ve serum örneği ve *brucella* ari sürülerden alınan 45 adet süt ve serum örnekleri tanısal duyarlılık ve özgüllüğün saptanmasında receiver-operating characteristic (ROC) ile analiz edildiler. Bu analizin sonucunda yüzde pozitivite (PP) olarak ifade edilen eşik değeri değeri, %29.3 olarak alınmıştır. Buna göre testin duyarlılığı (sensitivite) %96.15 [95% (güven eşiğindeki sınırlar (%80.36-99.9))] ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [95% (güven eşiğindeki sınırlar (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Sonuçlar, aynı hayvandan alınan süt ve serum sonuçları arasında korelasyon gösterdi. Süt ring testi (SRT), KFT ve RBPT sonuçlarına göre en yüksek oranda yanlış pozitif sonuç veren test oldu. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgular, indirekt süt ELISA prototipinin oldukça duyarlı ve özgül bir test olduğunu ve sütün mevcut olduğu durumlarda, hastalığın serolojik tanısı için süt sığırlarında stress yaratmadan kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Dolayısı ile süt örneklerinde ELISA'nın kullanımı ile süt sığırcılığı işletmelerinde bruselloz ile ilgili güvenilir ve sağlam veriler, ekonomik ve pratik olarak elde edilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella abortus*, Süt-ELISA, Sığır, SRT.

### Evaluation of Using ELISA in Milk for Diagnosis of Brucellosis in Cattle

**Abstract:** In this study, to develop an indirect milk ELISA prototype was aimed for the determination of anti *Brucella* antibodies in milk. Rose Bengal Plate Test (RBPT) and Complement fixation test (CFT) records of 36 serum and milk samples received earlier from the infected farms in which *B. abortus* biotype 3 had been isolated and identified and 45 milk and serum samples from brucellosis free herds were used for receiver-operating characteristic (ROC) analysis in determining diagnostic sensitivity and diagnostic specificity, respectively. According to the this analysis, cut off level stated as percent positivity (PP) was taken as 29.3%. Based on this value, the sensitivity of the test was determined as 96.15% with a 95% confidence interval (CI) [95% (80.36%-99.9%)] and a specificity of 95.65% [95% CI (85.16-99.47 %)]. Our results also showed correlation between antibody level in serum and milk received from the same animal. MRT showed the highest false positive results compared to CFT and RBPT results. As conclusion, our results indicated that the indirect milk ELISA prototype is a highly sensitive and specific test and it could be used without being invasive in dairy cattle for serologic diagnosis of brucellosis whenever milk available for this purpose. Therefore, reliable and robust data for brucellosis in dairy farms would be obtained practically and economically by using ELISA in milk samples in dairy farms.

**Keywords:** *Brucella abortus*, Milk-ELISA, Cattle, MRT.

### Giriş

Hayvanlarda büyük bir maddi kayba neden olan ve insanlarda da önemli bir zoonoz hastalık olan brusellozun indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testler bireyselden çok sürü tarama testleri olarak hastalığın teşhisinde en sık başvurulan yöntemleri oluşturmaktadır (Alton ve ark., 1988). Ancak brusellozun hastadaki her evresini, her epidemiyolojik durumda ve her hayvanda saptayacak tek bir serolojik test yoktur. Hastalığın serolojik teşhisinde OIE'nin önerdiği resmi testler olarak en çok Rose-Bengal Plate Testi (RBPT) ve Komplement Fiksasyon Testi (CFT) kullanılmaktadır. Bunun yanında aglutinasyon testleri, Coombs testi, ELISA, cELISA ve Floresans

Polarizasyon Testi (FPA) kullanılan diğer tekniklerdir (OIE, 2009). Bu testler için hayvanın kanının alınması gerekmektedir. Bu durum gerek hayvanda yarattığı stres ve gerekse maliyet giderleri açısından sütün yapılacak bir teste göre önemli dezavantajlar taşımaktadır. Bu nedenle sütün yapılacak serolojik testlerin serumdan yapılacak serolojik testlere göre önemli avantajları olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca sütteki ve serumdaki immunoglobulin seviyeleri arasında korelasyon bulunduğundan sütün içerdiği antikor seviyesi hayvanın serolojik tablosunu yansıtabilir (Ducrotoy ve ark., 2016; Sutra ve ark., 1986; Vanzini ve ark., 1998). Günümüzde gerek bireysel ve gerekse tank süt örneklerinde tarama

testi olarak süt ring testi (SRT) uygulanmaktadır. Ancak basit ve pratik bir test olan SRT'nin süt-ELISA'ya göre önemli dezavantajları vardır. Bunlar arasında, doğumdan hemen sonra ve laktasyonun sonuna doğru alınan sütlerde, mastitisli sütlerde, donmuş sütlerde kullanılamaması, testin duyarlık ve özgüllüğünün daha düşük olması sayılabilir. Ayrıca enfeksiyonun erken dönemlerinde yeterli duyarlılık göstermemesi ve etçi sığırlarda çok sınırlı bir kullanım alanı bulması diğer dezavantajlarıdır (Nicoletti, 1969; OIE, 2009).

Çok sayıda araştırmacı çeşitli antijenlerin kullanıldığı süt ve serumda uygulanan ELISA tabanlı çalışmalar yapmışlar ve ELISA'nın SRT ile saptanandan çok daha düşük titrede antikor saptadığını ve bu nedenle gerek bireysel ve gerekse tank sütlerinde iyi bir tarama testi olduğunu bildirmişlerdir (Thoen ve ark.1979; Boraker ve ark. 1981; Chand ve ark. 2005; Titarelli ve ark, 2011; Vanzini ve ark.,1998).

Bu çalışmada kan serumu ve süt içerdiği antikorlar yönünden karşılaştırıldığında, sütte uygulanacak ELISA prototipin serum ELISA ya karşı hayvanlarda güvenle kullanılabilir bir alternatif olup olmadığı değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metot

**Bakteriyel suş ve referans serum ELISA antijeni:** Çalışmanın yapılması Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.03.2015 Tarih ve 2015/07 nolu kararı ile uygun bulunmuştur. Çalışmada XXX Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önceki çalışmalarda izole edilmiş ve *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlanan suş kullanıldı. Laboratuvarda geliştirilen ELISA (in house serum ELISA) için kullanılacak solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edildi

**Referans pozitif ve negatif süt ve serum örnekleri:** Yeni geliştirilen süt ELISA prototipi için ROC analizlerinin yapılmasında, pozitif ve negatif referans materyalleri kullanıldı. Bu amaçla, daha önce etkenin izole edildiği enfekte sığır sürüsünden alınan 36 adet serum ve süt örneği, pozitif referans süt (PRS) ve bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt örneği ise negatif referans süt (NRS) olarak kullanıldı. Bu serum örneklerinin bilinen KFT ve RBPT sonuçları ROC analizinde testin duyarlık, özgüllük ve eşik değerinin saptanmasında kullanıldı.

**Test serum ve süt örnekleri:** Daha önce brusellozun görüldüğü (A, B, C, D) ve görülmediği (E ve F) olmak üzere toplam 6 ayrı sürüden alınan kan

ve süt örnekleri, geliştirilen süt ve serum ELISA, RBPT ve süt ring testi (SRT) ile test edildiler. Bu testlerde PRS ve NRS ve serum kontrolleri kullanıldı. F ve D sürülerinden sadece süt örnekleri alınırken diğer sürülerden aynı hayvandan hem süt ve hem de serum örnekleri alındı.

**Antijen Üretimi:** Bu amaçla Yi ve Hackett'in (2000) bildirmiş olduğu Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntemle su ve organik fazlar ayrıldı. İçinde ekstrakte edilen ham LPS bulunan su fazı ayrı bir steril tüpte toplandı ve -20°C de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

Laboratuvarda geliştirilen (in house) serum ELISA için Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edilen solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) 1:6000 oranında ELISA kaplama solüsyonu ile sulandırılarak pleytlere kaplandı.

**Süt örneklerinden etken izolasyonu çalışmaları:** Süt örneklerinden etken izolasyonu için OIE Manuel'de (2009) bildirilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla süt numuneleri, santrifüj edilerek üstteki krema ve alttaki tortudan selektif Farrel's mediyuma ekim yapıldı. Ayrıca bu numuneler ön zenginleştirmeğe alındılar ve örnekler negatif olarak kabul edilmeden önce %5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 6 haftaya kadar inkübe edildiler.

**Serolojik testler:** Süt örneklerinin alındığı hayvanların kan serumları RBPT ve indirekt ELISA ile test edildiler. Tüm test süt örneklerine SRT ve indirekt süt ELISA uygulandı. RBPT ve SRT antijenleri Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'nden temin edildi. Bu testlerin (RBPT ve SRT) uygulanması Alton ve ark.'nın (1988) belirttiği yöntemle göre yapıldı.

**İndirekt serum ve süt ELISA:** İndirekt ELISA, Vanzini ve ark.'nın (1998) bildirdiği yöntemle göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Serum ELISA solid faz antijeni 0.05 M sodyum karbonat (pH 9.6) içinde 1:6000 oranında sulandırıldı. Süt ELISA antijeni için ise test yeni geliştirildiği için kullanılacak antijen ve PRS ve NRS arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyon optimum antijen olarak seçildi. Her iki ELISA içinde seçilen antijen dilüsyonları 96 gözlü düz tabanlı maxisorp polistiren pleytlere (NUNC 692620) kaplandı. Daha sonra antijenle kaplanan pleytlere 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi ve %3 yağı alınmış süttozu içeren PBS solüsyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytlere %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandılar. Serum ELISA'da primer antikor bağlanması aşamasında, her hayvan

**Tablo 1.** Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

A çiftliği (infekte)	M ELISA	SRT	S-ELISA	RBPT	Kültür
10	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-
1	-	+	-	-	-
<b>B çiftliği (infekte)</b>					
5	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-
1	-	+	-	-	-
1	+	-	+	-	-
1	-	-	+	+	-
<b>C çiftliği (infekte)</b>					
9	-	-	-	-	-
1	-	+	+	+	-
<b>39 Toplam</b>	11 (%28.2)	13(%33.3)	13(%33.3)	12(%30.8)	5(%12.8)
<b>E çiftliği (non infekte)</b>					
13	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-
<b>17</b>	0	4(%23.5)	0	0	0

**Tablo 2.** Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

D çiftliği (infekte)	Milk ELISA	SRT	Kültür
3	-	+	-
4	+	+	-
2	+	+	+
1	-	-	+
1	+	-	-
7	-	-	-
<b>17</b>	7 (%41.2)	9 (%52.9)	3 (%17.6)
<b>F çiftliği (non infekte)</b>			
7	-	+	-
8	-	-	-
<b>15</b>	0	7 (% 46.6)	0

türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 süt tozu içeren PBS/T solüsyonu içinde 1: 50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl olarak konuldu. Süt ELISA için ise NRS, PRS ve test süt örneklerinden 100 µl olarak her numune için ikişer kez olmak üzere pleyte konuldu. İnkübasyon ve yıkama aşamalarından sonra horse-radishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini (Pierce 32490) belirlenen dilüsyonda %1 süt tozu içeren PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Pleytlerin otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Serum ELISA'nın sonuçlarının belirtilmesi aşağıda tanımlandığı gibi yapıldı.

Yüzdeler pozitivite (Percent positivity PP) hesaplanmasında, test örneğinin optik dansitesinden ortalama negatif serum optik dansitesi çıkarıldı. Elde edilen değer, ortalama pozitif serum kontrolü ve ortalama negatif serum kontrolü optik dansiteleri arasındaki farka bölündü. Sonuç 100 ile çarpıldığında PP bulunmuş oldu. Süt ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü, referens pozitif ve negatif serumların KFT ve RBPT sonuçlarına göre yapılan ROC analizinin sonucunda belirlenen eşik değerine göre yapıldı.

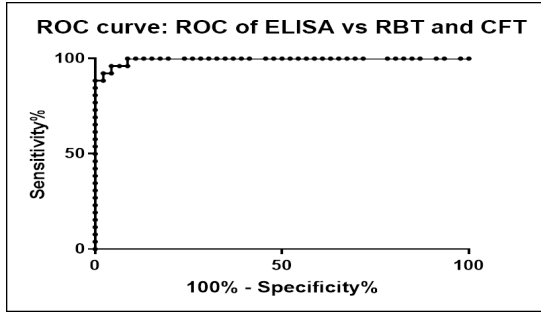
### İstatiksel analiz

ROC analizi, %95 güven eşiğindeki güvenlik aralıkları, tanısal duyarlık ve özgüllük Medcalc software programı kullanılarak yapıldı (Schoonjans ve ark., 1995).

### Bulgular

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre duyarlılık (sensitivite), %96,15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar

(%80.36-99.9]) ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) %29.3 PP olarak belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. RBPT ve KFT sonuçları baz alınarak yapılan milk ELISA ROC analizi sonuçları. Area under curve (AUC=0.9941)

Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 1.de gösterildi. Buna göre enfekte A, B, C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12.8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA (%33,3) ile alınırken bunu, RBPT (%30.8) ve süt ELISA (%28.2) izledi. Enfekte olmayan F çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuçlar verdi. Sadece %23.5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. (Tablo 1)

Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 2.de gösterildi. Buna göre enfekte D çiftliğinde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%17.6). En fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken, bunu süt ELISA (%41.2) izledi. Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdi. Ancak SRT ile %46.6 oranında pozitif sonuç alındı.

## Tartışma ve Sonuç

Brusellozun teşhisinde bakteriyel izolasyon ve identifikasyon altın standart ve en spesifik yöntem olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu yöntemin, çok sayıda örneğin teşhisi için pratik olmaması, zaman alıcı olması, deneyimli personele ihtiyaç göstermesi ve aynı zamanda uygulayıcı için riskli olması nedeniyle brusellozun teşhisinde serolojik yöntemler geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (Alton ve ark.,1988; Corbel, 1989).

Serum ve süt örnekleri iyi birer antikor kaynağı oldukları için bu örneklerde çok sayıda serolojik test uygulanmaktadır. Süt örneklerinde *B. abortus* için antikor aramaya yönelik testlerin başında süt ring testi gelmektedir. Süt sığırcılığı işletmelerinde süt, hayvandan alınmasının daha kolay olması, hayvanda stres yaratmaması ve daha az masraflı olması, tek

bir testin çok sayıda hayvanın test sonuçlarını temsil etmesi (tank süt örnekleri gibi), nedenleri ile serolojik yoklamalarda sık kullanılan bir örnek olarak kabul edilmekte ve bu nedenlerle SRT *Brucella* ile enfekte sığır sürülerinin teşhisinde geniş çaplı olarak yıllardır kullanılmakta olan pratik bir tarama testidir (Alton ve ark., 1988; Ducrotoy ve ark., 2016; Kerkhofs ve ark., 1986). Ancak SRT, özellikle büyük sürülerden alınan tank süt örneklerinde ve erken enfeksiyonların tanısında yeterli duyarlılık gösterememekte, mastitisli, donmuş, doğumdan hemen sonra, laktasyon periyodunun sonuna doğru alınan örneklerde kullanılmamaktadır. Ayrıca mastitisli sütlerde ve kolostrumda yalancı pozitif reaksiyonlar verebilmektedir. Bunun yanında, milk ELISA'nın SRT'den çok daha hassas ve spesifik olduğu bildirilmektedir (Chand ve ark., 2005; OIE, 2009; Sutra ve ark., 1986).

Çalışmamızda bu nedenlerden dolayı, SRT deki dezavantajları taşımayan bir süt ELISA prototipi geliştirildi. Farklı antijenlerin kullanıldığı çok sayıda süt ELISA çalışması bildirilmiştir. Bu çalışmalarda araştırmacılar tüm hücre antijeni, bakterinin LPS tabakası ya da ham LPS gibi farklı antijenler kullanarak farklı duyarlılık ve özgüllükte ELISA formatları geliştirmişlerdir (Thoen ve ark.,1979; Titarelli ve ark., 2011).

Çalışmada antijen olarak *B. abortus* biyotip 3 suşunun ham LPS tabakası antijen olarak kullanıldı. Ham LPS tabakası gerek S-LPS ve gerekse dış membran proteinlerini içerdiği için (Ducrotoy ve ark., 2016) sadece saf LPS tabakasına göre daha fazla hedef epitop taşıyacağı ve dolayısı ile daha duyarlı olacağı düşünüldü. Çalışmada geliştirilen süt ELISA'nın tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü saptamak amacı ile kullanılan referens materyaller kullanılarak yapılan ROC analizi ile testin tanısal duyarlılık ve özgüllüğü sırası ile %96.15 [%95 (güven eşiğindeki sınırları (%80.36-99.9))] ve %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırları (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) %29.3 PP olarak belirlendi (Şekil 1).

Romero ve ark.'nın (1995) geliştirdiği süt ELISA için özgüllüğü %100 ve duyarlılığı %98.2 olarak bulmuşlardır. Biancifiore ve ark. (1996), *Brucella* ari sürüden elde ettikleri süt örnekleri ile yaptıkları süt ELISA'da özgüllüğü %100 ancak RBPT ve KFT'ye göre süt ELISA'nın duyarlılığını sırası ile %65 ve %83 olarak bulmuşlardır. Bizim bulduğumuz özgüllük değerleri bu araştırmacılarca biraz düşük olmakla beraber duyarlılık oranımız bu araştırmacıların bulgularına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Chand ve ark. (2005) koyunlarda süt-ELISA'nın bruselloz ari sürüdeki özgüllüğü %100 ve enfekte sürülerde duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri sırasıyla %96.11 ve %94.28 olarak tespit etmişlerdir.

Bulduğumuz duyarlılık bu araştırmacıların elde ettiği düzeyle benzer bulunmuştur.

Nielsen ve ark. (1996) Şili'deki enfekte sürülerden sağlanan örnekler için %95'lik güven eşiği sınırlarında milk ELISA'nına duyarlılığın %95.2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içindeki duyarlılığın %98.7 olduğunu tespit etmişlerdir. Vanzini ve ark. (1998) süt ELISA'nın eşik değerini %36 yüzdeler seropozitivite (PP) seçerek, duyarlılığını %99.6 ve özgüllüğünü % 95.1 olarak bulmuşlar ve indirekt süt ELISA'nın yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren ve aynı anda çok sayıda örnekle çalışma imkânı sağlayan bir test olduğu sonucuna varmışlardır. Titarelli ve ark. (2011) manda sütlerindeki *brucella* antikorlarını saptamak üzere geliştirdikleri süt ELISA'da *B. abortus* biovar 1 in izole edildiği 3 ayrı enfekte sürüden topladıkları 30 pozitif süt örneği ve 100 negatif serum kullanarak geliştirdikleri testin duyarlılığını %100 (CI, %90.8-%100) ve özgüllüğünü %98 (CI, %93-%99.4) olarak saptamışlardır Çalışmamızda elde ettiğimiz duyarlılık ve özgüllük sonuçları bu araştırmacıların sonuçları ile de benzerlik göstermektedir.

Kolostrum ve süt aynı serum gibi enfekte ve aşıllı hayvanlarda Smooth *brucella* spp.ye karşı IgM, IgG ve IgA içermektedir. IgG1 ruminant sütündeki dominant antikor olup kolostrumdaki toplam antikorun %70-80'ini içermektedir. Bunu sırası ile IgM, IgA ve IgG2 izlemektedir. Sütteki çoğu IgA lokal olarak memede üretilmesine karşın süt ve kolostrumdaki IgG1'in çoğunluğu süte direkt olarak serumdan transfer edilmektedir. Kalan kısmı ise diğer Ig izotopları ile birlikte lokal olarak meme bezinde üretilmektedir (Sutra, 1986). Dolayısıyla süt, serum ve kolostrumdaki antikorların birbirleri ile korelasyon göstereceği kabul edilmektedir. Sığır serumu ve süt arasında antikorların ilişkili seviyelerde olduğunu gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Chand, 2005; Ducrotoy ve ark., 2016; Sutra, 1986). Süt örneklerine uygulanan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü serum örneklerine uygulananlarla benzer bulunduğundan, sütçü sığırlarda süt örneklerinin test edilmesi seruma göre daha ekonomik bir alternatif sağlamıştır. Sütteki immunoglobulin konsantrasyonu serum seviyeleri ile korelasyon gösterdiğinden süütün içerdiği antikor seviyesi hayvanın serolojik tablosunu yansıtacaktır (Ducrotoy ve ark., 2016; Kenyon ve Jenness, 1958; OIE, 2009). Bu olaydan yola çıkarak çalışmamızda ikisi enfekte olmayan ve 6'sı enfekte toplam 6 ayrı işletmeden süt ve kan örnekleri alınarak bunlarda SRT, RBPT, süt ve serum ELISA yapılmış ve sonuçlarda yukarıda bahsedilen korelasyon aranmıştır.

Buna göre sadece süt örneği alınan enfekte D çiftliği nde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve

identifiye edildi (%17.6). Milk ELISA için bulunan %29.3 PP eşik değeri dikkate alındı. Sonuçlara göre en fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken bunu %41.2 ile süt ELISA izlemiştir. Bu sonuçlar kültürün en az duyarlı ve SRT nin özgüllük ve duyarlılığının düşük olduğunu bildiren literatürlerle uyumludur (Alton ve ark., 1988; Corbel, 1989; OIE, 2009). Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuçlar verdi. Sadece %46.6 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Enfekte olmayan bir sürüde süt ELISA'nın hiçbir pozitiflik göstermemesi testin özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermektedir. SRT ise çapraz reaksiyonlarda, mastitisli ya da herhangi bir şekilde bozulmuş sütlerde yanlış pozitifleri oldukça sık gösteren bir test olduğundan alınan bu değer normal kabul edilmiştir. Enfekte D çiftliğinden bir hayvan süt ELISA ve SRT ile negatif reaksiyon vermiş ancak bu hayvandan *B. abortus* biyotip 3 izole edilmiştir. Literatürlerde negatif seroloji gösterip kültür pozitif hayvanların nadir olarak görüldüğünden bahsedilmektedir (Corbel, 1989; Ducrotoy ve ark., 2016). Bu nedenle kültür ile serolojinin beraber yürütülmesinin teşhisin güvenilirliğini artıracığı düşünülmüştür (Tablo 1).

Aynı hayvandan hem serum ve hem de süt örnekleri alınan enfekte A, B, C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12.8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA (%33.3) ile alınırken bunu ve takiben RBPT (%30.8) ve süt ELISA (%28.2) izledi. Alınan sonuçlar yukarıdaki paragrafta açıklanan nedenler ile beklenen sonuçlar olmakla birlikte süt ELISA yüzde pozitifite (%PP) değerlerinin serum ELISA'dan daha düşük çıkması kandaki antikor düzeyinin normalde daha yüksek olmasına bağlanabilir. B ve C çiftliklerine birer hayvanın süt ELISA ile negatif verip serum ELISA ile pozitif vermesinin mantıklı bir izahı olmamasına karşın henüz çok erken bir enfeksiyonun buna neden olabileceği düşünülmüştür. Enfekte olmayan F çiftliğinde olduğu gibi E çiftliğinde de beklediği üzere izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdi. Sadece %23.5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Test işletmelerinden izole edilen toplam 8 *B. abortus* biyotip 3'ün 7 tanesinin izole edildiği hayvanlardan alınan kan ve serumun kullanılan tüm serolojik testlerde pozitif yanıt vermesi, kültürün düşük duyarlılığı yanında son derece spesifik bir test olduğunu da beklediği üzere göstermiştir.

Çalışmanın sonucunda geliştirilmesi hedeflenen duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir süt ELISA prototipi geliştirildi. Bu prototipte konjugat olarak her hayvan türü için spesifik enzimle işaretlenmiş konjugat yerine, antikorlarının Fc bölgesine bağlanan enzimle işaretli A/G proteini kullanıldığından, bu testin ileride diğer türlerde de

kullanılma potansiyeli araştırılacaktır. Geliştirilen bu testin süt sığırcılığı işletmelerinde brusellosiz tanısında ve takibinde non invaziv bir tarzda hastalığın teşhisi kolay ve pratik ve daha ekonomik olarak yapılabilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuçta zoonoz karakterdeki bu hastalığın süt sığırcılığı işletmelerdeki durumu hakkında sağlıklı veriler elde edilmiş olacaktır.

Sonuçta burada sunulan bulgular ışığında sütün mevcut olduğu durumlarda sütte indirekt ELISA'nın hayvanı travmatize etmeksizin brusellozun serolojik teşhisinde kullanılabilir son derece değerli bir alternatif olduğu kanısına varılmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15144 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988: Bacteriological methods. In: "Techniques the Brucellosis Laboratory". INRA, Paris, France.
- Biancifiori F, Nannini D, Di Matteo A, Belfiore P, 1996: Assesment of an Indirekt ELISA in milk for the diagnosis of ovine brucellosis. *Com Immun Microbiol Infect Dis*, 19(1), 17-24.
- Broker DK, Stinebring WR, Kunkel JR, 1981: BrucELISA: an Enzyme-Antibody Immunoassay for detection of Brucella abortus Antibodies in milk: Correlation with the Brucella Ring Test and with Shedding of Viable Organism. *J Clin Microbiol*, 14(4), 396-403.
- Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, Poonia JS, 2005: Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. *Vet Microbiol*, 108(3-4), 305-11.
- Corbel MJ, 1989: Microbiology of the genus Brucella. In "Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects", Ed; Young EJ, Corbel MJ, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA
- Ducrotoy MJ, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I, 2016: A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol and Immunopathol*, 171, 81-102.
- Kenyon AJ, and Jenness R, 1958: Effects of proteins on agglutination of fat globules. *J. Dairy Sci*, 41, 716.
- Kerkhofs P, Botton Y, Thiange P, Dekeyser P, Limet N, 1990: Diagnosis of Bovine Brucellosis by Enzyme Immunoassay of milk. *Vet Microbiol*, 24, 73-80.
- Nicoletti P, 1969: Further evaluation of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am J Vet Res*, 30, 1811-1816.
- Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Cosmos C, Mueller P, Trottier J, Cote, G, Boag L, Bosse J, 1996: Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *VetMicrobiol*, 52(1-2), 165-173.
- OIE, 2009: Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines. Bovine Brucellosis Chapter (2.4.3). Third edition, Office International of Epizooties, Paris, France.
- Romero C, Pardo M, Grillo MS, Diaz R, 1995: Evaluation of PCR and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples For Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. *J Clin Microbiol* 33, 3.
- Schoonjans F, Zalata A, Depuydt C, Comhaire F, 1995: MedCalc: A new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed*, 48, 257-262
- Sutra L, Caffin JP, Dupray G, 1986: Role of Milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. *Vet Microbiol*, 12, 359-366.
- Titarelli M, Bonfini B, De Massis F, Giovannini A, Scacchia M, 2011: Standardisation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of brucella antibodies in milk from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Veterinaria Italiana*, 47(1), 59-64.
- Thoen CO, Pietz DE, Armbrust AL, Harrington R, 1979: Enzyme Immunoassay for Detecting Brucella antibodies in Cow's Milk. *J Clin Microbiol*, 10(2), 222-225.
- Vanzini VR, Aguirre N, Lugaesi CI, de Echaide ST, De Canavesia VG, Guglielmone AA, Marchesino MD, Nielsen K, 1998: Evaluation of an direct ELISA for the diagnosis of the bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentine. *Prev Vet Med*, 36 (3), 211-7.
- Yi EC, Hackett M, 2000: Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram negative bacteria. *Analyst*, 125(4), 651-656.

\*Bu araştırma makalesi, "Sığır brusellozunun teşhisi için sütte indirekt ELISA'nın kullanımının değerlendirilmesi" isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Çalışma için izin belgesi XXX Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

\*\*Yazışma Adresi: Sevil Erdenliğ Gürbilek  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD,  
Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: erdenlig@harran.edu.tr



## Investigation of The Effects of Silymarin on Valproic Acid-Induced Kidney Damage in Rats

İbrahim AKTAŞ<sup>1,a,\*</sup>, Dilek BAYRAM<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>School of Health Services, Department of Pharmacology, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0956-8204, <sup>b</sup>ORCID:0000 0003 3568 2673

Geliş Tarihi: 19.02.2020

Kabul Tarihi: 17.06.2020

**Abstract:** In this study; we aimed to investigate the protective effects of silymarin (SLY) against kidney damage on valproic acid (VPA)-induced rats using histological and biochemical evaluations. Experimental procedures were performed on 21 male Sprague Dawley rats. Rats were divided randomly into three groups: group 1, control; group 2, VPA; group 3, VPA+SLY. The control group was given 1 mL 0.9 % NaCl orally for 14 days. The VPA group was given 500 mg/kg/day VPA per os for 14 days. The VPA+SLY group was given 500 mg/kg/day VPA and 100 mg/kg/day SLY per os for 14 days. SLY treatment decreased the levels of creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) levels significantly ( $p < 0.05$ ). In addition, increased amount of thiobarbitüric acid reactive substance (TBARS) and decreased levels of glutathione (GSH) with VPA were significantly suppressed by SLY in kidney tissue ( $p < 0.05$ ). Histologically, the extent of kidney damage was remarkably lower in the VPA+SLY group ( $p < 0.005$ ). In addition, VPA+SLY group had decreased oxidative stress, increased antioxidant activity and decreased histopathological changes compared to VPA group. This study revealed that the kidney damage induced by VPA was attenuated with SLY administration. SLY can protect rat kidney against VPA induced damage via anti-oxidative effect and might be useful for reducing the severity of kidney injuries.

**Keywords:** Valproic acid, Silymarin, Kidney damage, Rat

### Sıçanlarda Valproik Asitin İndüklediği Böbrek Hasarı Üzerine Silimarinin Etkileri

**Özet:** Bu çalışmada, sıçan böbrek dokusunda valproik asit (VPA) kaynaklı hasara karşı silimarinin (SLY) koruyucu etkilerinin histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler kullanılarak araştırılması amaçlandı. Deneysel işlemler, 21 adet Sprague Dawley sıçanı üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar rastgele üç eşit gruba ayrıldı: grup 1, kontrol; grup 2, VPA; grup 3, VPA+SLY. Kontrol grubuna ağızdan 14 gün boyunca 1 mL %0.9 NaCl verildi. VPA grubuna ağızdan 500 mg/kg/gün VPA ve VPA+SLY grubuna ağızdan 500 mg/kg/gün VPA ve 100 mg/kg/gün SLY 14 gün süre ile uygulandı. SLY tedavisi ile kreatinin (Cr) ve kan üre azotu (BUN) seviyeleri anlamlı derecede düştü ( $p < 0.05$ ). Ek olarak, böbrek dokusunda VPA ile artan tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) seviyesi ve azalan glutatyon (GSH) seviyesi, SLY tarafından önemli ölçüde baskılandı ( $p < 0.05$ ). Histolojik inceleme sonucu, VPA+SLY grubunda böbrek hasarının derecesi anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0.005$ ). VPA+SLY grubunda; VPA grubuna göre oksidatif stres ve histopatolojik değişikliklerde azalma tespit edildi. Bu çalışma ile VPA'nın indüklediği böbrek hasarının SLY uygulaması ile azaldığı ortaya konuldu. SLY, sıçan böbreğinde VPA kaynaklı hasara karşı anti-oksidan etkisi böbreği koruyabilir ve böbrek hasarının boyutunu azaltmak için faydalı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Valproik asit, Silimarın, Böbrek hasarı, Sıçan

### Introduction

In general, valproic acid (VPA) is routinely used to treat certain types of epilepsy seizures in children and adults (Emekli-Alturfan et al., 2015). It inhibits the disintegration of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in synapses and increases its concentration in the environment, generating an antiepileptic effect (Dökmeci and Dökmeci, 2016). It also increases dopamine and serotonin levels. Therefore, it can be used in the treatment of diseases such as melancholy, brain tumor, generalized epilepsy, bipolar mania, psychiatric disorders and migraine (Ahangar et al., 2017; Heidari et al., 2018; Kudin et al., 2017; Semmler et al., 2017). Significant side effects have been reported with long-term use of VPA and some of them are; pancreatitis, elevated

liver enzymes, hepatitis, and bone marrow suppression. Among the earliest symptoms of VPA toxicity are anorexia, nausea, vomiting and gastralgia (Dökmeci and Dökmeci, 2016; Emekli-Alturfan et al., 2015). Production of reactive oxygen species (ROS) occurs with VPA application. It can directly damage cellular molecules such as proteins, lipids and DNA, and alter signal paths through the activation of redox-sensitive transcription factors. VPA treatment has been associated with oxidative stress in a number of studies in both human and animal models, particularly in the kidneys, causing serious damage to cells, necrosis and atrophy (Emekli-Alturfan et al., 2015; Goli et al., 2019; Heidari et al., 2018). VPA causes renal ROS, depletes

glutathione (GSH) reservoirs, reduces tissue antioxidant capacity; thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and other lipid peroxidation products increase the amount (Heidari et al., 2018). Vegetable ingredients containing enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms are required for the detoxification of ROS formed by VPA (Emekli-Alturfan et al., 2015).

Silymarin (SLY) is an extract from a milk thistle (*Silybum marianum*) plant. It also has anti-inflammatory, anti-apoptotic and antioxidant properties. SLY is mainly used in the treatment of kidney injuries such as alloxan-induced diabetes mellitus, renal ischemia-reperfusion injury and drug-induced toxicity (Goli et al., 2019; Hassan et al., 2017). In this case, SLY binds to receptors in renal cell membranes and prevents toxins from binding in these regions, thereby reducing drug-induced renal cellular damage (Kyriakopoulos et al., 2018). The protective effect of SLY is that it acts as a powerful antioxidant and neutralizes harmful free radicals resulting from the breakdown of toxic substances. In addition, SLY, by concentrating in kidney cells and ribonucleic acid polymerase enzyme regulation by increasing protein synthesis in the ribosome is to help repair and regeneration (Hassan et al., 2017; Li et al., 2017; Rafieian-Kopaie et al., 2012).

In this research, we aimed to investigate the possible renal protective effect of SLY against VPA-induced renal damage in rats.

## Materials and Methods

**Chemicals:** VPA and SLY were purchased from Liba Co (Turkey) and Madaus (Turkey), respectively. VPA and SLY doses were determined based on previous studies (Beydilli et al., 2015; Graf et al., 1998). Hydrochloric acid (HCl), trichloroacetic acid (TCA), thiobarbuturic acid (TBA) and paraffin were obtained from, Sigma-Aldrich (Germany). Xylene, hematoxylin-eosin and ethanol were obtained from Merck (Germany). All other chemicals were the best analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

**Animals:** In this study, 21 male Sprague-Dawley rats (210-250 g, for 8 weeks) were used. The study was carried out according to the protocol approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Firat University (Protocol 2019/07). The rats were housed in a 12 h dark: 12 h light cycle at 21°C with free access to water and feed.

**Treatment Protocol:** Animals were randomised into three groups, with seven rats in each group, as follows: Control, VPA and VPA+SLY. The control

group was given 1 mL 0.9% NaCl orally for 14 days. The VPA group was given 500 mg/kg/day VPA per os for 14 days (Tong et al., 1967). The VPA+SLY group was given 500 mg/kg/day VPA and 100 mg/kg/day SLY per os for 14 days (Beydilli et al., 2015). Body weights were determined at the beginning and the end of the study. Rats were euthanized by cervical dislocation under diethyl ether anesthesia at the end of the 14th day. The entire kidneys were excised and weighed, and were placed in formalin for histopathological analysis. In tissues with oxidative stress parameters, TBARS and GSH were preserved at -86 °C until analysis. Blood samples were collected from jugular veins, centrifuged for 5 minutes at 5,000 x g, and biochemical analysis was performed on the serum.

**Biochemical Evaluation:** Kidney serum biomarkers including creatine (Cr) mg/dL was analyzed with the Olympus 2700 analyzer (Olympus Diagnostica GmbH, Germany). In addition, blood urea nitrogen (BUN) mg/dL levels were evaluated according to Reitman–Frankel colorimetric transaminase procedure (Crowley, 1967).

**Oxidative Stress Biomarkers:** TBARS measurements were conducted in the kidney tissue (Casini et al., 1986). Two volumes of sample and two volumes of stock solution (0.375% thiobarbituric acid in 0.25 N HCl and 15% trichloroacetic acid) were mixed in a centrifuge tube. The solution was heated for 15 minutes in boiling water and then cooled. The solution was centrifuged at 5.000 g for 10 minutes to separate. Then the test samples were read at 532 nm on the spectrometer. This formula was used in the calculation ( $356,1 \times \text{adsorbent value} = \text{result nmol/gr (nonomol/g)}$ ) (Placer et al., 1966).

Glutathione (GSH) levels in raw kidney tissues were measured according to Sedlak and Lindsay (1968) method (Sedlak and Lindsay, 1968). Samples were precipitated with 50% TCA and centrifuged at 1000 x g for 5 minutes. In the supernatant of the precipitated sample, 0.5 mL was receipted, and 2 mL of Tris-EDTA buffer (0.2 M, pH = 8.9) and 0.1 mL of 0.01M 5.5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid were added. The mixture was allowed to stand at room temperature for 5 minutes and its adsorbance was measured at 412 nm on the spectrometer. This formula was used in the calculation ( $961 \times \text{adsorbent value} = \text{result } \mu\text{mol/g}$ ). In these two experimental studies Perkin Elmer Precisely, Lambda 25, UV/VIS spectrometer.

**Histopathological Examinations:** The kidney tissues taken from animals were fixed in 10% neutral formalin solution. After fixation, tissues

were washed overnight in running water. These washed samples were dehydrated with ethanol, cleared with xylene and embedded in paraffin. 4-5 µm thick sections were taken from the paraffin blocks with a rotary microtome (RM2125RTS, Leica, Germany). The samples from all groups were stained with hematoxylin & eosin for histopathological evaluation. Modified semi-quantitative scale were used for the evaluation of histopathological changes; [(0): none, (1): mild, (2): moderate, (3): severe grade] (Refaiye et al., 2011). Samples were evaluated and visualized with imaging-assisted binocular light microscopy (ECLIPSE Ni-U, Nikon, and Tokyo, Japan).

**Statistical Analyze:** SPSS version 20.0 was used for statistical analysis. Shapiro-Wilk test was used to evaluate normality. One-way ANOVA and post-hoc,

LSD were applied for in-group comparisons of parametric data; Kruskal Wallis test was used for non-parametric biochemical data. The same test was also used for semi-qualified evaluation of histopathological scores and for differences in the data measured between the groups. Mann-Whitney U test was used to compare the two groups. Data were considered statistically significant for  $p \leq 0.05$ .

## Results

**Biochemical Evaluation:** Cr and BUN levels were significantly increased in VPA group compared to control group and VPA + SLY group ( $p < 0.03$ ). SLY treatment resulted in a significant decrease in VPA-induced Cr and BUN levels in VPA + SLY group compared to VPA group ( $p < 0.04$ ) (Table 1).

**Table 1.** Serum biochemical and kidney tissue oxidative stress biomarkers of the experimental groups.

	Control	VPA	VPA + SLY
<b>Serum biochemical biomarkers</b>			
Cr (mg/dL)	0.48 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>a,c</sup>	0.46 ± 0.014 <sup>b</sup>
BUN (mg/dL)	54.71 ± 1.18 <sup>b</sup>	62.42 ± 0.94 <sup>a</sup>	53.16 ± 1.13 <sup>b</sup>
<b>Tissue oxidative stress biomarkers</b>			
GSH (µmole/gr tissue)	0.265 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.222 ± 0.003 <sup>a,c</sup>	0.251 ± 0.007 <sup>b</sup>
TBARS (nmole/gr tissue)	0.129 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.194 ± 0.007 <sup>a,c</sup>	0.134 ± 0.011 <sup>b</sup>

Data are means ± SEM,  $n = 7$ . <sup>a</sup> Significantly different from control, <sup>a</sup>  $p < 0.02$ , <sup>b</sup> significantly different from VPA, <sup>b</sup>  $p < 0.04$ , <sup>c</sup> significantly different from VPA + SLY, <sup>c</sup>  $p < 0.05$ . VPA, valproic acid; SLY, slymarin; GSH, glutathione; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; Cr, creatinine and BUN, blood urea nitrogen.

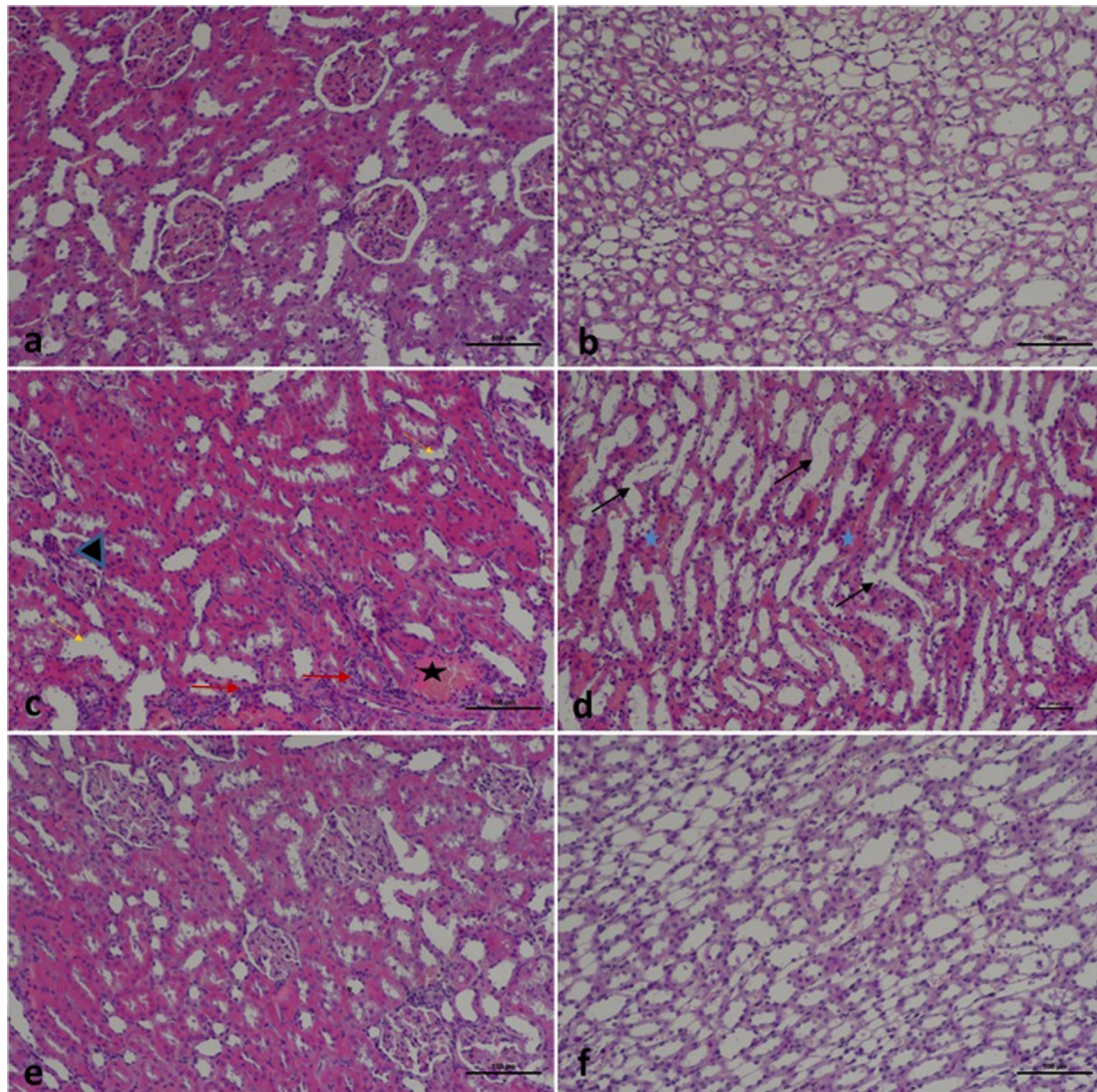
**Table 2.** Histopathological scoring of kidney sections of experimental groups.

Parameters/scores	Control	VPA	VPA+SLY
Dilation of Proximal Distal Tubules	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Glomerular Degeneration	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Vascular Congestion	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Hemorrhagic Areas	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Mononuclear Cell Infiltrations	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Tubular Dilatation in Medulla	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>
Degeneration of Proximal Distal Tubules	-	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>

Scoring as described in the methods section.  $n = 7$ . VPA, valproic acid; SLY, slymarin; <sup>a</sup> VPA increased kidney damage,  $p < 0.05$  vs. control group. <sup>b</sup> SLY reduced kidney damage,  $p < 0.05$  vs. VPA group.

**Oxidative Stress Biomarkers:** The results in Table 1 showed a significantly higher level of TBARS ( $p < 0.03$ ) and significantly lower levels of GSH ( $p < 0.03$ ) in the VPA group. SLY treatment resulted in a

significant decrease in VPA-induced TBARS level ( $p < 0.04$ ) and a significant increase in VPA-reduced GSH level ( $p < 0.04$ ) in VPA+SLY group compared to VPA group.



**Figure 1.** Rat kidney tissue section. a-b; control group; normal histological appearance is observed in kidney tissue sections (a; cortex; bowman capsule, distal, proximal tubules b; medulla; collecting tubules), (H-E, x20). c-d; VPA given to the group; kidney tissue sections: c (cortex), d (medulla); red arrows; mononuclear cell infiltrations; yellow arrows; blue star shows hemorrhagic areas in the medulla (c-d; H – E, x20); VPA+SLY given group; Kidney tissue sections, e (cortex) and f (medulla) compared to VPA group and cortex and significant improvement in the medulla (e-f; H – E, x20). Showed decrease of histopathological findings compared to VPA group.

**Histopathological Results:** The histological examination of the kidney tissue sections of the control group showed no difference from the normal histological structures (Figure 1: a-b, Table 2). When the kidney tissues of the VPA group were examined, significant histopathological changes were observed compared to the control group ( $p < 0.05$ ). These changes; dilatation and degeneration of the proximal distal tubules, glomerular degeneration, vascular congestion, hemorrhagic areas, tubular dilatation of the medulla and mononuclear cell infiltrations (Figure 1: c-d, Table 2). In the VPA+SLY group, a significant improvement was observed in histopathological findings compared to the VPA group ( $p < 0.05$ ) (Figure 1: e-f, Table 2).

## Discussion and Conclusions

Long-term use of VPA for the treatment of epilepsy has been reported to cause many side effects in the liver, kidneys, pancreas, central nervous system and hemopoietic system (Belcastro et al., 2013). The kidney is an important organ that plays a role in blood filtration in the body. Among its main duties are; removing waste products, balancing electrolytes in the body, controlling blood pressure, stimulating the production of red blood cells, regulating water balance and maintaining acid-base balance in the blood. The drugs and metabolites that fill the treatment process in the body are excreted in the urine by the kidneys. Therefore, the use of drugs other than the treatment dose may cause damage to the kidneys

(Nerdy and Ritarwan, 2019). Although VPA is relatively a safe drug, it can cause serious side effects on the biological system when used at higher concentrations and for extended periods of time (Chaudhary et al., 2017).

Oxidative stress is the shift of the balance between ROS and antioxidants formed as a result of toxicity in the body to the ROS side. TBARS resulted from ROS is a product of lipid peroxidation, an important indicator of oxidative stress (Shoji and Koletzko, 2007). It also plays an important role in the pathogenesis of DNA. The level of oxidative stress occurring in the body is tolerated by enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. GSH is a non-enzymatic antioxidant (Arora and Singh, 2014; Roshan and Stanton, 2013; Xu et al., 2005). Oxidative stress caused by VPA application is considered as one of the factors leading to kidney dysfunction (Hassan et al., 2017b). Results; the increase in ROS levels increased tissue lipid peroxidation (TBARS) and decreased antioxidant activity (GSH) (de Avelar et al., 2017; Heidari et al., 2018; Placer et al., 1966). According to the hypothesis announced by the researchers, SLY reduces lipid peroxidation due to its antioxidant properties and increases endogenous concentrations of antioxidant enzymes such as GSH, thereby reducing nephropathy by preventing cellular damage (Goli et al., 2019; Zheng et al., 2014). In addition, SLY sweeps up the free radicals and prevents lipid peroxidation, thereby reducing the damage to the cells and fixing the cell membrane (Shereen et al., 2013).

With the breakdown of protein during digestion, ammonia is formed and reaches the liver through blood. Here, ammonia turns into BUN, which is less dangerous for the body. BUN, which comes to the kidneys through the blood, is drained out of the body through urine by filtering here (Bilgic, 2020). Cr; It is formed during the daily movement of muscles and is a natural waste product in the body. This product is found in the body, blood and urine. Then it is excreted from the body with the help of kidneys. The blood must be as clean as possible for the body to function optimally. A high level of Cr in the blood puts a person at risk for potentially life-threatening kidney disorders such as uremia (Oh and Briefel, 2017). BUN and Cr are metabolic waste products that are excreted in the urine by the kidneys, and only a small amount remains in the blood. Since serum levels cannot be excreted in the urine, it increases in kidney degeneration. For example; chronic hypertension, diabetes, kidney stones, kidney inflammation, kidney infection, dehydration (Speir et al., 2015). This accumulated toxic substance causes tubular

cell damage by changing the permeability of kidney cells and causing cellular destruction (Hassan et al., 2017b). The chemical structure of VPA contains an eight-carbon fatty acid called propyl acetate. This structure interacts with the cell membrane, causing toxic effects. As an indicator of this toxicity in the cell membrane, it causes an increase in by-products such as BUN and Cr (Ibrahim et al., 2017). In our study, serum Cr and BUN levels increased as a biochemical evidence of kidney damage in VPA treatment. The results we obtained in the present study are consistent with the literature (de Avelar et al., 2017; Heidari et al., 2018). SLY therapy; showed regenerative properties of damaged kidney cells. In addition, it decreased Cr and BUN levels closer to the control group (Güzel et al., 2019). Our study is compatible with the literature information (Goli et al., 2019).

In this study, VPA showed significant histological changes in the kidneys. In the histological examination of the VPA group; dilatation and degeneration in proximal and distal tubules, glomerular degeneration, vascular congestion, hemorrhagic regions, mononuclear cell infiltrations in the cortex, tubular dilation and degeneration, hemorrhagic regions in the medulla were observed (Figure 1: c-d, Table 2). These degenerative findings were also found in the SLY-treated group, but were less severe than the VPA group (Figure 1: e-f, Table 2). In the study of Heidari et al. (2018), animals treated with VPA (500 mg/kg) for 14 days showed interstitial nephritis, fibrosis and tissue necrosis in the kidney (Heidari et al., 2018). SLY increases the regeneration of renal tubular cells, provides membrane stabilization and improves kidney tissue damage (Li et al., 2017). In addition, SLY increased the endogenous antioxidant defense system, reduced VPA-induced cellular damage and retained histological structure (Hassan et al., 2017a; Kandimalla et al., 2017). In another study, Goli et al. (2019) reduced degenerative and necrotic changes of SLY were observed in rats with diabetes mellitus. Its mechanism may be to reduce proteinuria and weaken diabetic kidney damage due to its antioxidant function (Goli et al., 2019).

In conclusion, the results of the present study showed that SLY improved the biochemical, histological and structural changes of VPA-induced kidney damage in rats. In addition, mechanisms of these effects may include inhibition of lipid peroxidation and protection of antioxidant enzymes. Because of its antioxidant activity, SLY may protect kidney against the damage caused by VPA. However, further studies should be conducted to determine the mechanisms of underlying the therapeutic effects of SLY.



## References

- Ahangar N, Naderi M, Noroozi A, Ghasemi M, Zamani E, Shaki F, 2017: Zinc deficiency and oxidative stress involved in valproic acid induced hepatotoxicity: Protection by zinc and selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res*, 179(1), 102–9.
- Arora M, Singh UK, 2014: Oxidative Stress: Meeting Multiple Targets in Pathogenesis of Diabetic Nephropath. *Curr Drug Targets*, 15, 531-8.
- Belcastro VD, Egidio C, Striano P, Verrotti A, 2013: Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. *Epilepsy Res*, 107(1-2), 1-8.
- Beydilli H, Yilmaz N, Cetin ES, Topal Y, Celik O, Sahin C, Topal H, Cigerci IH, Sozen H, 2015: Evaluation of the protective effect of silibinin against diazinon induced hepatotoxicity and free-radical damage in rat liver. *Iran Red Crescent Med J*, 17(4), 1-7.
- Bilgiç MA, 2020 BUN nedir? Medikal Park. <https://www.medicalpark.com.tr/bun/hg-2186>, Erişim tarihi; 09.06.2020.
- Casini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M, 1986: Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol*, 123(3), 520-31.
- Chaudhary S, Ganjoo P, Raiusddin S, Parvez S, 2015: Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid. *Protoplasma*, 252(1), 209-17.
- Crowley LV, 1967: The Reitman-Frankel colorimetric transaminase procedure in suspected myocardial infarction. *Clin Chem*, 13(6), 1-7.
- de Avelar CR, Pereira EM, de Farias Costa PR, de Jesus RP, de Oliveira LPM, 2017: Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 23(27), 5004-17.
- Dökmeci İ, Dökmeci AH, 2016: Sağlık Yüksek Okulları İçin Farmakoloji. 2. Baskı, İstanbul Tıp Kitapevi, İstanbul, Türkiye.
- Emekli-Alturfan E, Alev B, Tunali S, Oktay S, Tunali-Akbay T, Ozturk LK, Yanardag R, Yarat A, 2015: Effects of edaravone on cardiac damage in valproic acid induced toxicity. *Ann Clin Lab Sci*, 45(2), 166-72.
- Goli F, Karimi J, Khodadadi I, Tayebinia H, Kheiripour N, Hashemnia M, Rahimi R, 2019: Silymarin attenuates ELMO-1 and KIM-1 expression and oxidative stress in the kidney of rats with type 2 diabetes. *Indian J Clin Biochem*, 34(2), 172-9.
- Graf W, Oleinik O, Glauser T, Maertens P, Eder D, Pippenger C, 1998: Altered antioxidant enzyme activities in children with a serious adverse experience related to valproic acid therapy. *Neuropediatrics*, 29 (4), 195-201.
- Guzel S, Sahinogullari ZU, Canacankatan N, Antmen SE, Kibar D, Coskun Yilmaz B, 2019: Potential renoprotective effects of silymarin against vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*, 1-7.
- Hassan SMS, Youakim MF, Rizk AAE, Thomann C, Ahmad Z, 2017a: Does silybin protect against toxicity induced by polymyxin E in rat kidney? *NeuroUrol Urodyn*, 36(5), 1278–87.
- Hassan SS, Thomann C, Ettarh R, Ahmad Z, 2017b: Possible protective role of silybin against polymyxin E-induced toxic effect in rat kidneys: A biochemical approach. *NeuroUrol Urodyn*, 36(8), 2003–10.
- Heidari R, Jafari F, Khodaei F, Shirazi Yeganeh B, Niknahad H, 2018: Mechanism of valproic acid-induced fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney. *Nephrology*, 23(4), 351-61.
- Ibrahim MA, Abdel-Karim RI, Tamam HG, Mohamed AA, Wani FA, 2017: Protective effect of silymarin and ascorbic acid in valproic acid-induced hepatic toxicity in male albino Rats. *Mansoura J Forens Med Clin Toxicol*, .25( 2), 33-49.
- Kandimalla R, Dash S, Bhowal AC, Kalita S, Talukdar NC, Kundu S, Kotoky J, 2017: Glycogen-gold nanohybrid escalates the potency of silymarin. *Int J Nanomedicine*, 12, 7025-38.
- Kudin AP, Mawasi H, Eisenkraft A, Elger CE, Bialer M, Kunz WS, 2017: Mitochondrial liver toxicity of valproic acid and its acid derivatives is related to inhibition of  $\alpha$ -lipoamide dehydrogenase. *Int J Mol Sci*, 18(9), 1-11.
- Kyriakopoulos G, Tsaroucha AK, Valsami G, Lambropoulou M, Kostomitsopoulos N, Christodoulou E, Kakazanis Z, Anagnostopoulos C, Tsalikidis C, Simopoulos CE, 2018: Silibinin improves TNF- $\alpha$  and M30 expression and histological parameters in rat kidneys after hepatic ischemia/reperfusion. *J Investig Surg*, 31(3), 201-9.
- Li Y, Ye Z, Lai W, Rao J, Huang W, Zhang X, Yao Z, Lou T, 2017: Activation of sirtuin 3 by silybin attenuates mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced acute kidney injury. *Front Pharmacol*, 8, 1-12.
- Nerdy N, Ritarwan K, 2019: Hepatoprotective activity and nephroprotective activity of peel extract from three varieties of the passion fruit (*Passiflora* Sp.) in the albino rat. *Open access Maced J Med Sci*, 7(4), 536-42.
- Oh MS, Briefel G, 2017: Evaluation of renal function, water, electrolytes, and acid-base balance. 23rd ed, Elsevier, St Louis, USA.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC, 1966: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16(2), 359-64.
- Rafieian-Kopaie M, Nasri H, 2012: Silymarin and diabetic nephropathy. *J Renal Inj Prev*, 1(1), 3–5.
- Refaiy A, Muhammad E, ElGanainy EO, 2011: Semiquantitative smoothelin expression in detection of muscle invasion in transurethral resection and cystectomy specimens in cases of urinary bladder carcinoma. *African J Urol*, 17(1), 6-10.
- Roshan B, Stanton R., 2013: A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. *J Nephropathol*, 2, 234-240.
- Sedlak J, Lindsay RH, 1968: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25(1), 192-205.
- Semmler A, Frisch C, Bleul C, Smith D, Bigler L, Prost JC, Blom H, Linnebank M, 2017: Intrauterine valproate exposure is associated with alterations in

- hippocampal cell numbers and folate metabolism in a rat model of valproate teratogenicity. *Seizure*, 46, 7–12.
- Shoji H, Koletzko B, 2007: Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10, 324-8.
- Shereen AE,; Manar HA,; Taiseer RI, 2013: Influence of Silymarin on Valproic Acid Induced Hepatotoxicity in Adult Male Albino Rats. *Ain Shams J Forensic Med Clin Toxicol*, 20, 221-32.
- Speir RW, Stallings JD, Andrews JM, Gelnett MS, Brand TC, Salgar SK, 2015: Effects of valproic acid and dexamethasone administration on early bio-markers and gene expression profile in acute kidney ischemia-reperfusion injury in the rat. *PLoS One*, 10(5), 1–24.
- Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS, 2005: Valproic acid I: Time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci*, 86(2), 427–35.
- Xu Y, Osborne BW, Stanton RC, 2005: Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(5), 1040–7.
- Zheng Q, Liu W, Liu Z, Zhao H, Han X, Zhao M, 2014: Valproic acid protects septic mice from renal injury by reducing the inflammatory response. *J Surg Res*, 192(1), 163–9.

**\*Correspondence author:** İbrahim AKTAŞ  
School of Health Services, Department of Pharmacology,  
Adiyaman University, Adiyaman, Turkey  
**e.mail:** iaktas@adiyaman.edu.tr



## Şanlıurfa'da Üretilen Urfa Peynirlerinde Nikel Düzeyleri\*

Serap KILIÇ ALTUN<sup>1,a,\*\*</sup>, Nilgün PAKSOY<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4203-2508, <sup>b</sup>ORCID:0000-0001-6231-5524

Geliş Tarihi: 05.03.2020

Kabul Tarihi: 18.06.2020

**Özet:** Peynir, çeşitli tat ve tekstürde üretilen, süt kazeininin pıhtılaşması ile oluşan hayvansal bir gıdadır. Bu çalışmanın amacı Şanlıurfa'da üretilen Urfa peynirlerinde orta düzeyde toksik olan nikel element düzeyinin belirlenmesidir. Örneklerde nikel element düzeyi analizleri ICP-MS ile mikrodalga yakma işleminden sonra gerçekleştirilmiştir. Urfa peyniri örneklerindeki nikel düzeyleri en düşük 0.059, en yüksek 0.401, ortalama ise 0.204 mg/kg düzeyinde bulunmuştur. Analiz edilen peynir örneklerinin nikel düzeylerinin günlük tolere edilebilir limitin üzerinde olmadığı görülmektedir. Peynir üreticilerinin nikel kontaminasyon kaynakları hakkında bilinçlendirilmesi, üretim yerlerinin endüstriyel alanlardan uzak olması, tüm süt ve süt ürünlerinde rutin kontrollerin devam ettirilmesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Urfa peyniri, Nikel, ICP-MS.

### Nickel Levels in Urfa Cheeses Produced in Şanlıurfa

**Abstract:** Cheese is a food produced by the coagulation of milk casein and is produced in various taste and texture. The aim of this study was to determine the level of nickel in Urfa cheeses produced in Şanlıurfa. The analysis of nickel in cheese samples were performed after microwave digestion with ICP-MS. Nickel levels of Urfa cheese samples were at minimum 0.059, at maximum 0.401 and at average 0.204 mg/kg. The nickel levels of the cheese samples analyzed were not above the daily tolerable limit. It is important for the public health to raise the awareness of cheese producers about the sources of nickel contamination, to keep production sites away from industrial areas and to maintain routine controls on all dairy products.

**Keywords:** Urfa cheese, Nickel, ICP-MS.

### Giriş

Peynir, çeşitli tat ve tekstürde üretilen, süt kazeininin pıhtılaşması ile oluşan hayvansal bir gıdadır. İnsanların beslenme konusunda bilgi ve tercihlerindeki artış, üretilen peynir miktarının ve çeşitliliğinin de artmasına sebep olmuştur. Ulusal Süt Konseyi'nin Türkiye Süt Sektör İstatistikleri Özet Raporu ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre ülkemizde 2018 yılında 753.230 ton peynir üretilmiş ve kişi başına yıllık peynir tüketim miktarımızın 18.4 kg olduğu belirtilmiştir (Anonim, 2018). Yaygın üretilen ve tüketilen beyaz peynir, kaşar peyniri gibi çeşitlerinin dışında Türkiye yöresel peynir çeşitliliği zengin olan ülkeler arasındadır. Yöresel peynir çeşitlerinden biri olan Urfa peyniri, Şanlıurfa ve yöresinde, genellikle koyun sütü ile yapılan bir peynir çeşididir (Akin ve Şahan, 1998). Urfa peyniri yörede yalnızca kahvaltılarda değil pek çok tatlı ve tuzlu tarifte yer aldığından yörede tüketimi yaygındır.

Bileşiminde bulunan protein, yağ ve vitaminlerin dışında peynir; sodyum, fosfor ve kalsiyum gibi metabolizmaya faydalı makro-elementler bakımından da zengin bir gıdadır (Mendil, 2006). Peynirde makro-elementlerin yanı sıra çinko, demir, bakır ve nikel gibi iz elementler de

bulunmaktadır (Mendil, 2006). Nikel ilk olarak 1751'de İsveçli kimyager Cronstedt tarafından izole edilmiş olan, doğal olarak beş izotopu bulunan, sert, gümüşi beyaz renkte, yer kabuğunun en yaygın yedinci elementidir (Sharma, 2013). Nikel insan beslenmesinde çoğunluğu sebze kökenli olmak üzere günlük ortalama 300 µg düzeyinde diyetle alınmaktadır (Biego ve ark., 1998; Larsen ve ark., 2002). Nikel, diğer metallerle çok sayıda alaşım oluşturur. Demir, nikel çelik alaşımı son derece sert ve korozyona dayanıklı olup; dünya çapında üretilen nikelin çoğu, çoğunlukla gıda işleme ekipmanı ve kapları üretmek için kullanılan paslanmaz çelik üretiminde kullanılmaktadır (Sharma, 2013) Nikelin diğer geçiş metalleri ile karşılaştırıldığında orta derecede toksik bir element olmasına rağmen, solunum sistemi kanseri de dahil olmak üzere ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği bilinmektedir. Ayrıca, nikel ağız yoluyla yoğun miktarda maruz kalma yaygın egzama ve ürtiker benzeri lezyonlara sebep olabilir. Bu nedenle, gıdalardaki nikel içeriğinin bilinmesi, özellikle nikel hassasiyeti olan bireylerin diyet kontrolü için büyük önem taşımaktadır (Yebra ve ark., 2008; Schiavino ve ark., 2006). Peynirdeki nikel kontaminasyonunun

muhtemel sebepleri; hammadde olan sütte hayvan besini kökenli nikel olabileceği gibi üretim prosesinde kullanılan nikelden üretilmiş alet ekipman ve kazanlar olabilir.

Çeşitli peynirlerde nikel element düzeyinin ölçülmesi amacıyla indüklenmiş plazma-optik emisyon spektrometresi (ICP-OES), endüktif olarak eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS), atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS), alev atomik absorpsiyon spektrometresi (FAAS) gibi farklı yöntemler kullanılmıştır (Özlü ve ark., 2012; Öztürk, 2009; Temurci ve Güner, 2006; İşleyici ve ark., 2017; Kılıçel ve ark., 2004; Öksüztepe ve ark., 2013). Bu çalışmanın amacı Şanlıurfa'da üretilen Urfa peynirlerinde orta düzeyde toksik olan nikel element düzeyinin belirlenmesidir.

### Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında 28 adet Urfa peynir örneği Şanlıurfa ili merkez ilçelerinden perakende olarak satışa sunulan yerel üreticilerden alındı. 250'şer g olmak üzere temin edildi, soğuk zincir şartlarına uyularak derhal laboratuvara getirildi ve analiz işlemine kadar -19 °C de muhafazası sağlandı. Peynir örneklerinden homojenizasyon işleminin ardından 1'er gram tartılarak mikrodalga cihazının örnek kaplarına alındı. Üzerine 4 mL % 65'lik (v/v) nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ve 2 mL % 30'luk (v/v) hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pipetle ilave edilerek mikrodalga cihazına yerleştirildi. Önceden belirlenen programla peynir örnekleri mikrodalga fırında yakma işlemine tabi tutuldu (Tablo 1). Yakma işlemi gerçekleştirilen peynir örnekleri soğuduktan sonra steril tüplere alınarak ultra saf su ile dilue edildi.

**Tablo 1.** Mikrodalga yakma işlem aşamaları

Kademe	Uygulanan ısı (°C)	Süre (dk)
1	90	7
2	170	5
3	210	25

Peynir örneklerinin nikel analizleri Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarındaki Agilent marka, 7500ce serisi ICP-MS (Tokyo, Japan) cihazı ile yapıldı.

### Bulgular

Çalışma kapsamında ICP-MS ile analiz edilen her bir peynir örneğinin nikel miktarı Tablo 2'de, peynir örneklerinin nikel değerlerinin ortalaması, standart sapmaları ile en düşük ve en yüksek değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Urfa peyniri örneklerinin nikel düzeyleri (mg/kg)

Örnek No	Nikel düzeyi
n1	0.165
n2	0.157
n3	0.182
n4	0.174
n5	0.163
n6	0.200
n7	0.222
n8	0.221
n9	0.124
n10	0.185
n11	0.138
n12	0.192
n13	0.193
n14	0.174
n15	0.141
n16	0.216
n17	0.161
n18	0.195
n19	0.157
n20	0.395
n21	0.151
n22	0.176
n23	0.227
n24	0.356
n25	0.059
n26	0.341
n27	0.260
n28	0.401

**Tablo 3.** Urfa peynir örneklerinin tanımlayıcı nikel düzeyleri (mg/kg)

n	En düşük	En yüksek	X±Sx
28	0.059	0.401	0.204 ± 0.08

### Tartışma ve Sonuç

Sağlıklı beslenmede önemli rolü olan peynir gelişen endüstri ve teknoloji ile birlikte nikel gibi metallere kontamine olabilmektedir (Özlü ve ark., 2012). Peynirin içerdiği nikel düzeyi üzerine, peynir üretim prosesi, proseste kullanılan ekipmanın ham maddesi, çevresel faktörler, hayvan yemleri, su, laktasyon periyodu gibi pek çok faktör etkili olmaktadır (Öztürk, 2009). Nikel doğada yaygın bulunan bir element olup insanlarda toksik etkilerinin sanayileşmenin yoğun olduğu yaşam alanlarında ve metropollerde daha yaygın olduğu bildirilmiştir (WHO Regional Office for Europe, 2000).

Bu çalışmada analiz edilen peynir örneklerinde ortalama nikel düzeyi 0.204 mg/kg olarak tespit edilmişken, Temurci ve Güner tarafından 2006 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada Ankara iline bağlı dört farklı ilçeden toplanan beyaz peynir

örneklerinde nikelin 2.371 mg/kg düzeyinde olduğu rapor edilmiştir (Temurci ve Güner, 2006). Özlü ve ark. (2012)'nin Erzurum ilinde 50 adet kaşar peynir ile yapmış oldukları çalışmada ise ortalama 0.27 mg/kg düzeyinde nikel tespit etmişlerdir. İşleyici ve ark. (2017)'nin 20 adet divle tulum peyniri ile yapmış oldukları çalışmada 0.167 mg/kg nikel tespit edilmiştir. Kılıçel ve ark. (2004)'nin Van ilinde 35 adet lor ile gerçekleştirmiş oldukları çalışmada ise araştırmacılar ortalama 0.30 mg/kg düzeyinde nikel rapor etmişlerdir. 2013 yılında Öksüztepe ve ark.'nin 25 adet çökelek ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise nikel düzeylerinin tespit edilebilir sınırın altında kaldığını bildirilmiştir (Öksüztepe ve ark., 2013). Mendil'in 2003 yılında Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladığı dokuz çeşit toplam 45 peynir örneği ile atomik absorpsiyon yöntemi kullanarak yapmış olduğu çalışmada; Van otlu peynirinde 0.22, Tokat peynirinde 0.34, Trabzon tel peynirinde 0.22, Erzincan tulum peynirinde 0.26, Ordu Çerkez peynirinde 0.21, Çeçil peynirde 0.24, Kars kaşarında 0.18, Kayseri çömlek peynirinde 0.20, beyaz peynirde 0.23 µg/g düzeyinde nikel elementi ölçtüğü bildirilmiştir (Mendil, 2006). Vural ve ark.'nin 2004-2005 yılları arasında 50 adet otlu peynir ile yapmış oldukları çalışmada; Şırnak'tan topladıkları örneklerde 2.4, Silopi'den topladıkları peynirlerde 2.5, Cizre'den 2.7, İdil'den 3.1 µg/g düzeyinde nikel elementi alev atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi ile tespit etmiştir. Araştırmacıların rapor ettiği nikel düzeyleri diğerlerine kıyasla oldukça yüksek düzeydedir (Vural ve ark., 2008). Orak ve ark.'nin İstanbul ilinden toplamış oldukları 40 adet beyaz peynir örneğinde atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle yaptıkları çalışmada peynirlerde ortalama 1.057 µg/g düzeyinde nikel elementi olduğunu rapor etmişlerdir (Orak ve ark., 2005).

Türkiye'de peynirin nikel düzeyinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda tespit edilen nikel düzeyleri ile bu çalışmada tespit edilen nikel düzeyleri kıyaslandığında pek çoğu ile benzer olup, bazılarında da düşük bulunmuştur. Yebra ve ark. (2008)'lerinin İspanya'da altı farklı peynir örneğiyle alev atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi ile yapmış oldukları çalışmada; koyun peyniri örneğinde 0.45, taze peynir örneğinde 0.54, krem peynir örneğinde 0.57, dilim peynir örneğinde 0.61, mozzarella örneğinde 0.49 ve rende peynir örneğinde 0.42 µg/g düzeyinde nikel tespit etmişlerdir. Türk Gıda Kodeksi "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ"inde bazı gıdalarda nikel için kabul edilebilir en yüksek değer 0.2 mg/kg olarak belirlenmişken peynir için herhangi bir üst limit belirlenmemiştir (Anonim, 2002).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) insanlar için tolere edilebilir günlük alım dozunun her bir kilogram vücut ağırlığı için 5 µg olduğunu rapor etmiştir. Bu değer temel alındığında bu çalışmada analiz edilen peynir örneklerinin nikel düzeylerinin günlük tolere edilebilir limitin üzerinde olmadığı görülmektedir. Bunun muhtemel sebebi Şanlıurfa ilinde endüstriyel faaliyetlerin az olması ve Urfa peynirlerinin genellikle köylerde üretiliyor olması olabilir. Peynir üreticilerinin nikel kontaminasyon kaynakları hakkında bilinçlendirilmesi, üretim yerlerinin endüstriyel alanlardan uzak olması, tüm süt ve süt ürünlerinde rutin kontrollerin devam ettirilmesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Aynı zamanda Türk Gıda Kodeksinin ilgili tebliğine peynir ve diğer süt ürünleri için kabul edilebilir en yüksek değer verileri belirlenmesi önerilir.

### Kaynaklar

- Akın MS, Şahan N, 1998: Şanlıurfa'da üretilen taze Urfa peynirlerinin kimyasal ve duyu özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 21-22 Mayıs 1998, Tekirdağ, Türkiye, ss. 21-22.
- Anonim, 2018: <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/tuik-2018-yili-sut-urunleri-uretim-rakamlarini-acikladi-2557/>, Erişim tarihi; 04.05.2020.
- Anonim, 2002: Tebliğ, T. G. K. Türk Gıda Kodeksi gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğ (No: 2002/63). *Resmî gazete*, (24885).
- Biego GH, Joyeux M, Hartemann P, Debry G, 1998: Daily intake of essential minerals and metallic micropollutants from foods in France. *Sci Total Environ*, 217(1-2), 27-36.
- İşleyici Ö, Sancak YC, Tuncay RM, Yücel UM, 2017: Determination of Mineral Substance and Heavy Metal Levels in Divle Tulum Cheese. *Van Vet J*, 28(3), 151-156.
- Kılıçel F, Tarakçı Z, Sancak H, Durmaz H, 2004: Otlu lorların mineral madde ve ağır metal içerikleri. *YYU Tar Bil DerG*, 14(1), 41-45.
- Larsen EH, Andersen NL, Møller A, Petersen A, Mortensen GK, Petersen J, 2002. Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Addit & Contam*, 19(1), 33-46.
- Mendil D, 2006. Mineral and trace metal levels in some cheese collected from Turkey. *Food Chem*, 96(4), 532-537.
- Orak H, Altun M, Ercag E, 2005. Survey of Heavy Metals in Turkish White Cheese. *Ital J Food Sci*, 17(1), 95-100.
- Öksüztepe G, İncili GK, Uysal İA, 2013: Elazığ'da Satılan Çökelek ve Kurutların Mineral Madde ve Ağır Metal Düzeyleri. *Vet Sci*, 8(3), 1-9.
- Özlü H, Aydemir Atasever M, Urçar S, Atasever M, 2012: Erzurum'da Tüketime Sunulan Kaşar Peynirlerinin Mineral Madde İçeriği ve Ağır Metal Kontaminasyonu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(2), 205-208.

- Öztürk BE, 2009. Trakya Bölgesinde Satılan Kaşar Peynirlerinde Ağır Metal Aranması. Yüksek lisans tezi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Schiavino D, Nucera E, Alonzi C, Buonomo A, Pollastrini E, Roncallo C, De Pasquale T, Lombardo C, La Torre G, Sabato, V, Pecora, V, Patriarca G, 2006: A clinical trial of oral hyposensitization in systemic allergy to nickel. *Int J ImmunopatholPharmacol* 19(3), 593-600.
- Sharma AD, 2013: Low nickel diet in dermatology. *Indian J Dermatol*, 58(3), 240.
- Temurci H, Güner A, 2006. Ankara'da tüketime sunulan süt ve beyaz peynirlerde ağır metal kontaminasyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 1(2), 20-28.
- Vural A, Narin I, 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(1-3), 27-33.
- WHO Regional Office for Europe, 2000: Air Quality Guidelines, second ed. Copenhagen, Denmark. <[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0014/123080/AQG2ndEd\\_6\\_10Ni.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0014/123080/AQG2ndEd_6_10Ni.pdf)> (Chapter 6.10. Ni).
- Yebra MC, Cancela S, Cespón RM, 2008: Automatic determination of nickel in foods by flame atomic absorption spectrometry. *Food Chem*, 108(2), 774-8.
- \*Bu araştırma 29 Kasım- 01 Aralık 2019 tarihlerinde Şanlıurfa'da düzenlenen 1. Uluslararası GAP Gıda, Tarım ve Veteriner Bilimleri Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.
- \*\*Yazışma Adresi:** Serap KILIÇ ALTUN  
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
**e-mail:** skilicaltun@harran.edu.tr

## Effects of Oral and Topical *Momordica Charantia*-Propolis Premix on Wound Healing

Elif DOĞAN<sup>1,a,\*</sup>, Güler YENİCE<sup>2,b</sup>, Semin GEDİKLİ<sup>3,c</sup>, Sıtkıcan OKUR<sup>4,d</sup>

<sup>1</sup>Kastamonu University Faculty of Veterinary Medicine Department of Surgery, Kastamonu, Turkey

<sup>2</sup>Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, Erzurum, Turkey

<sup>3</sup>Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine Department of Histology and Embryology, Erzurum, Turkey

<sup>4</sup>Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine Department of Surgery, Erzurum, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3321-8116, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-0819-8843, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-8238-7226, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-2620-897X

Tarihi: 16.03.2020

Kabul Tarihi: 17.06.2020

**Abstract:** *Momordica charantia* and Propolis (MCP) are reported to have antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory properties. The present study determines the efficacy of the oral and topical administration of MCP on wound healing in 60 adult male rats. The wounds in the control rats were left untreated, the rats in the MCP-oral group were treated with oral MCP, and the animals in the MCP-topical group were treated by pouring MCP powder onto the wound. The wound size was measured on the 3rd, 7th, 14th and 21st days, and tissue specimens were taken from five animals in both groups. The tissue samples were evaluated histopathologically. Remission following treatment during the follow-up period was described as a percentage of the original wound size for each rat. A two-way ANOVA was used for the analysis of data. The mean wound surface area was measured as 1.69 cm<sup>2</sup>. At the end of the experiment, the average reduction was 81.40 % in MCP-topically and 87.85% in MCP-orally treated wounds. The lowest decrease in wound size was measured in the control group (45.55 %). Wound size reduction was not significantly different between the MCP groups at the end of the experiment. Re-epithelialization and neovascularization were complete in both the MCP-oral and MCP-topical groups up to day 21. Overall, the treatments with oral and topical MCP were equally effective in wound healing. MCP application can be considered for the acceleration of wound healing, in both oral and topical administrations.

**Keywords:** *Momordica charantia*, Propolis, Rat, Wound healing.

### Momordica Charantia-Propolis Premiksinin Yara İyileşmesinde Oral ve Topikal Etkileri

**Özet:** *Momordica charantia* ve Propolis'in (MCP) antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, 60 yetişkin erkek sıçanda MCP'nin oral ve topikal uygulanmasının yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kontrol sıçanlarındaki yaralar tedavi edilmeden bırakıldı, MCP-oral gruptaki sıçanlar oral MCP ile tedavi edildi ve MCP topikal grubundaki hayvanlar, yara üzerine MCP tozu dökülerek tedavi edildi. Yara boyutu 3., 7., 14. ve 21. günlerde ölçüldü ve her iki gruptaki beş hayvandan doku örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi. Takip süresi boyunca tedaviyi takiben remisyon, her sıçan için orijinal yara boyutunun yüzdesi olarak tanımlandı. Verilerin analizi için iki yönlü bir ANOVA kullanıldı. Ortalama yara yüzey alanı 1.69 cm<sup>2</sup> olarak ölçüldü. Deneyin sonunda ortalama azalma MCP-topikal grubunda %81.40 ve MCP-oral grubundaki yaralarda %87.85 idi. Yara boyutundaki en düşük azalma kontrol grubunda (%45.55) ölçüldü. Yara boyutundaki küçülme, deney sonunda MCP grupları arasında önemli ölçüde farklı değildi. 21. güne kadar hem MCP-oral hem de MCP-topikal gruplarda yeniden epitelizeasyon ve neovaskülarizasyon tamamlandı. Genel olarak, oral ve topikal MCP ile yapılan tedaviler yara iyileşmesinde eşit derecede etkilidir. *Momordica charantia* ve Propolis'in hem oral hem de topikal uygulamaları yara iyileşmesinin hızlandırılması için düşünülebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Momordica charantia*, Propolis Rat, Yara iyileşmesi.

### Introduction

Wound healing is a process that includes hemostasis, inflammation, proliferation and maturation. The effects of various substances as an aid to tissue repair has been a subject of research for many years. Factors such as age, nutrition, radiation, medicine, hypertension, diabetes and obesity delay wound healing (Diegelmann, 2004). Although many drugs are used for the treatment of wounds, allergic reactions and the cost of

medications are factors that limit their use (Kim, 2017). *Momordica charantia* (MC) is a plant that is widely used in many countries as both a food ingredient and for its medicinal properties (Das, 2015; Sahu, 2011), having anti-diabetic, anti-bacterial, anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-ulcer, anti-fungal, anti-depressant and analgesic uses (Ahmad, 2012; Sahu, 2011; Zhang, 1992). It accelerates the regeneration process and tissue

healing by producing growth factors and increasing fibroblastic activity (Ono, 2009). According to several experimental studies (Sankaranarayanan, 1993; Singh, 2017), the application of a MC powder to a wound area increases wound contraction, accelerates wound healing, shortens the epithelization period, improves stress resistance and hastens wound regeneration. *Momordica charantia* is frequently used for the topical treatment of skin wounds and orally for treatment of disease such as gastric ulcers and diabetes (Grover, 2004).

Propolis, which is thought to accelerate wound healing, is a resinous material that is collected from plants by honeybees (Basim, 2006). In recent years, propolis has come to be considered as a complementary drug due to its therapeutic properties, and has been the subject of comprehensive researches. Many components have been identified in the chemical composition of propolis, such as polyphenols, flavonoids, serpens quinones, coumaric acid, amino acids, steroids and inorganic compounds. Propolis has various biological properties, being antibacterial (Keskin, 2001) antifungal (Koç, 2005), antioxidant (Simões, 2004), anti-inflammatory (Miyataka, 1997) and immune-system stimulating (Gu, 2005). Propolis has generally been applied topically to skin wounds by researchers (Atayoglu, 2016; Ragab, 2015). Since topical propolis has high potential for wound healing, it can accelerate the healing process by reducing the number of mast cells (Wang, 2008). The use of topical drugs is described as the direct application of a drug to the skin for the treatment of skin damage. Topical drugs offer some advantages, such as the absence of a first pass metabolism, the absence of gastrointestinal inadaptability and the more precise application to a specific site (Singla, 2012). If animals feel uncomfortable, however, any bandage applied after a topical application should be removed (Anderson, 2000). As animals may aggravate the wound area among the various drug delivery routes, the oral route may be more advantageous. Studies have reported that MC is always used topically on wounds and orally for other diseases (Ahmad, 2012; Sahu, 2011; Zhang, 1992). Propolis is already in use topically in wound cases (Atayoglu, 2016; Ragab, 2015). A review of literature identified no scientific investigation to date conducted of the effect of oral administration of this premix on wound healing. The present study aims to compare the efficacy of the oral and topical administration of MCP on excision wounds.

## Material and Methods

The animal experiments were performed after gaining approval from the Ethical Committee (decision no: 2018/38) Atatürk University, Erzurum, Turkey. Six months old, male, Sprague-Dawley rats (N = 60) weighing 350–400 g were used for the study. Rat chow and tap water were given *ad libitum*. The rats were kept at 22.0 °C ± 1.0 °C with 12 hours per day of light. The experimental rats were divided randomly into three groups containing twenty rats each, named the control, treatment orally and treatment topically groups.

Xylazine HCl (8 mg/kg, Xylazinbio 2%, Bioveta, Czech republic) and ketamine HCl (60 mg/kg, Ketazol 10%, Richter pharma, Austria) were used intramuscularly for anesthesia in all animals. The rats were positioned in sternal recumbency and the hair on the back was shaved. After the skin was prepared with 70% ethanol, one (1) full-thickness excision wound was made to the midline involving the removal of a 1.3 cm x 1.3 cm (1.69 cm<sup>2</sup>) section of skin by using punch biopsy.

The wounds in the control group was untreated, while the wounds in the treatment groups were treated topically and orally (250 mg/kg) with MCP (Kudret narı & Propolis capsule 375 MG\*60 capsule, MC 200 mg, propolis 100 mg, capsule 75 mg, Balen, Turkey). MCP capsule was broken and the powder inside the capsule was poured into the wound area in topically groups. In groups orally, this powder was dissolved in 1 ml of saline and administered by gavage. The wounds were protected with a bandage (sterile gauze compress, PAK, Istanbul, Turkey; and adhesive tape, Cansin Plast, Kocaeli, Turkey). The medication was applied daily until the end of study.

The unhealed wound area was measured on the 3rd, 7th, 14th and 21st days under general anesthesia using a transparent paper and a special marker pen (Mahmood, 2010). The wound closure was calculated as percentage reduction from the wound size on day zero using the following formula: (Agren, 1997)

$$\text{Epithelization (\%)} = \frac{100 \times (\text{wound size on } d_0 - \text{wound size on } d_x)}{\text{wound size on } d_0}$$

On the 3rd, 7th, 14th and 21st days, the five rats in each group were sacrificed with a lethal dose mixture (Xylazine HCL and Ketamine HCL) and the wounded areas were collected. The tissues collected from the wound sites were fixed in a 10 % neutral formalin solution for 72 hours. Skin specimens were embedded in paraffin wax after xylene and in a graded alcohol series. Sections measuring 5-µm thick were cut using a microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and

stained with Mallory’s triple stain, modified by Crossman (Lemo, 2010). The stained specimens were examined under a light microscope (Nikon Eclipse i50, Tokyo, Japan) using an approximately 4x objective lens, and photographic images were taken for histological evaluation. The specimens were evaluated and scored for acute inflammatory reaction, thickness of granulation tissue, fibroblast maturation, collagenation, re-epithelialization and neovascularization. The scores were determined as 0: none, 1: mild, 2: moderate and 3: abundant (Abramov, 2007)

**Data collection and analyses.** The statistical analysis involved a two-way ANOVA, to assess the effect of treatment. Histopathological scores were reported in median values in a univariate analysis (SPSS version 16.0, Chicago, IL). Values of P <0.05 were considered statistically significant (Dogan, 2017)

**Results**

**Wound size.** When the wounds were first created, the surface area measured was 1.69 cm<sup>2</sup>. The wound size was found to have decreased in all wounds at the end of the study. In the entire sample, the mean percent reduction in wound size compared to the original wound area was 30.33% ± 1.51 (range 27.28% – 33.37%), 48.13% ± 1.51 (range 45.08% – 51.17%), 73.73% ± 1.51 (range 70.68% – 76.77%) and 87.40% ± 1.51 (range 84.35% – 90.44%) on days 3, 7, 14 and 21, respectively. Overall, within the 21 days, tissue repair in the MCP-orally group was faster than that in the MCP-topically group, as reflected by the lower reduction in wound size when compared to the original wound size (81.40% versus 87.85%). The experimental wounds on the 21<sup>st</sup> day were more advanced in healing response in the MCP-treated groups (84.62%) when compared to the control group (45.55%) (P < 0.0001) (see Table 1).

**Table 1.** Wound healing rate

Effects	% reduction in wound size after 21 days	P > F
Treatment		0.0001
Untreated	45.55±1.31 <sup>b</sup>	
MCP-oral	87.85±1.31 <sup>a</sup>	
MCP-topical	81.40±1.31 <sup>a</sup>	
Day		0.0001
3	30.33±1.51 <sup>d</sup>	
7	48.13±1.51 <sup>c</sup>	
14	73.73±1.51 <sup>b</sup>	
21	87.40±1.51 <sup>a</sup>	

The original wound size was 1.69 cm<sup>2</sup>.

<sup>a-d</sup> indicates statistical different among rows with the main effect categories (P <0.05).

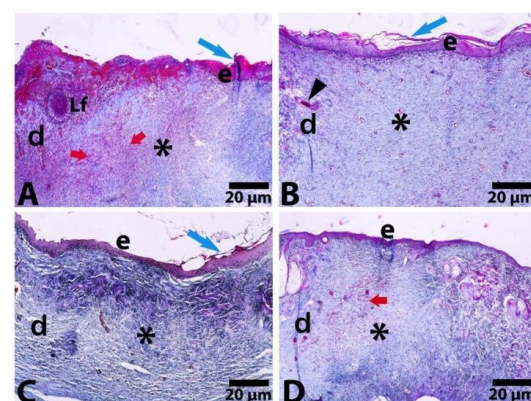
**Wound macroscopy.** Mild erythema was observed on the wound edges in the untreated rats and the topical MCP rats on day 3. On day 7, a thin layer of tissue was observed at the base of the wound in both MCP groups. Wound contraction on day 14 was recorded to be highest in the MCP-orally treated wounds, followed by the MCP-topically and untreated wounds. On day 21, the highest wound contraction was noted in the topical MCP group (see figure 1).



**Figure 1.** Macroscopy images of wounds in rats

**Histopathology**

**Quantitative microscopy.** Overall, more prominent necrotic areas, lymph follicles and dense hemorrhagic areas were detected in the control group. Acute inflammatory reaction scores were higher in the control and MCP oral groups than MCP topical group on the 14th day (1.00 versus 0.00), though acute inflammatory reaction was not observed in all groups at the end of the study. On day 21, the amount of collagen was found to have increased in both MCP groups (1.00 versus 2.00).



**Figure 2.** Microscopy images of wounds in rats at the end of the study.



On the 14th day, granulation tissue was determined as the highest score (score of 2) in all three groups. However, on 21 days, while the score was 1 in the MCP-orally and control groups, it was 0 in MCP-topically group. Fibroblast maturation (median score of 1) was observed on day 3 in the MCP-orally group and on day 7 in the MCP-topically group. Neovascularization had increased in both the MCP groups by the end of the study period (1.00 versus 3.00). Reepithelization was prominent in the MCP-orally group on day 3, while full reepithelialization and neovascularization was recorded in both the MCP groups by the end of the study (median score of 3) (see Table 2). In general, when the MCP treatments are compared with the untreated control wounds, equally effective histopathological parameters were reported in both MCP groups at the end of the study. (see Figure 2).

## Discussion

Wound healing is a basic response to tissue damage. Although there have been many studies of this subject, the best curative agent is still under discussion. Although the wound healing process has improved, studies have reported that healing times have not been shortened (Pillai, 2010). The main approach to wound healing should involve the prevention if the invasion of damaged tissue by microorganisms, and improving the damaged tissue, for which many medical products have been used. Propolis, or bee glue, is used primarily for the therapeutic treatment of wounds and burns (Oryan, 2018), and MC is used to achieve the same effect. The efficacy of the topical use of these on wounds has been studied (Hussan, 2014; Ragab, 2015). No

**Table 2.** Median histopathological evaluation scores of wounded tissue by treatment group.

Effects	Acute Inflammatory reaction	Granulation tissue	Fibroblast maturation	Collagenation	Re-epithelization	Neo-vascularization
Treatment						
Untreated	1.50 <sup>a</sup>	1.00	1.50	1.00 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	1.00 <sup>b</sup>
MCP-oral	1.50 <sup>a</sup>	1.00	1.50	1.50 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>
MCP-topical	1.00 <sup>b</sup>	1.00	1.50	1.50 <sup>a</sup>	1.50 <sup>b</sup>	2.00 <sup>a</sup>
Day						
3	3.0 <sup>a</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	1.0 <sup>d</sup>
7	2.0 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1.5 <sup>c</sup>
14	0 <sup>c</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>
21	0 <sup>c</sup>	0.5 <sup>c</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>

The scores<sup>26</sup> were 0= none, 1=mild, 2= moderate, and 3= abundant.

<sup>a-d</sup> indicates statistical different among rows with the main effect categories (P <0.05).

studies reporting on the use of this premix (MC and propolis) were identified in a review of literature. In this study, MCP was administered both orally and topically to compare its efficacy on wound healing. Oral and topical use were compared in the present study due to the lack of studies into the oral administration of MCP for wound treatment in literature.

Various medicinal plants have been used to promote wound healing (Kim, 2011). The use of such products has increased significantly in recent years in animals. Among such substances, propolis is a resinous material collected by honeybees from living plants, while MC is a type of creeper plant, and both are known to be strong antioxidants, anti-inflammatories and antibacterial. Studies of wound healing have reported the success of these substances on wound healing processes as a result of their wound healing effects (Atayoglu, 2016; Hussan, 2014). In present study, the epithelization percentage was considered a clinical healing parameter. The epithelialization rate was calculated to be approximately 70% within 3 weeks in both MCP groups, but did not reach 100% in either of the MCP-group rats. Wounds treated with MCP-topical reached a greater percent contraction than the

MCP- orally group. It has been reported that wound contraction is very important in clinical evaluations of wound healing (Oryan, 2018). In this study, in both the MCP-orally and MCP- topically groups, there was no significant difference in the contraction rate of the wounds, and also in this study, histopathological parameters explained the changes in the wound site. The acute inflammatory reaction score on the 3rd day following wound creation may indicate the success of wound induction. The absence of any chronic inflammation at the end of the study may indicate that 21 days is a sufficient follow-up period. In parallel, it is reported that proliferation, granulation and contraction occur between 4-21 days in the wound healing process (Keast, 2000).

Throughout the study, the increased collagenation, fibroblast maturation, granulation tissue amount, neovascularization and reepithelization scores noted in reply to medication were prominent in wound healing. Collagen tissue plays important roles in all stages of wound healing. Tissue synthesized by fibroblasts is particularly active in the proliferative and remodeling phases, and forms the basis of the intracellular matrix formation (Baum, 2005). In the present study, it was

observed that this parameter increased in MCP groups up until the end of the experiment. As collagen synthesis begins on day 3 in injured tissue (Ramos, 2007), the histopathological findings on the third day were compared. While no collagen tissue was observed in the control group, it was observed at level 1 in the MCP groups. In a wound healing process, fibroblasts secrete an extracellular matrix that joins the edges of the wound (Otranto, 2010). This stage can be clinically monitored in terms of granulation tissue formation (Velnar, 2009), however, fibroblast maturation and the formation of granulation tissue between the MCP-oral and MCP-topical treatment groups were not statistically significant. Re-epithelialization is required for complete closure of the wound (Otranto, 2010). In the present study, it was high score in MCP groups than in the control group, however, both of MCP groups were not significant each other.

In conclusion, the clinical and histological effects of the oral and topical administration of MCP in wounds inflicted on healthy rats were compared with control wounds. Our findings suggest that an MCP premix may be useful in wound healing. In the MCP groups, the level of reduction of wound size when compared to the untreated group showed a statistically significant difference, while no statistically significant difference was noted between the MCP-oral and MCP-topical groups. Histopathological changes such as inflammatory reaction, granulation tissue formation, collagenation, fibroblast maturation, reepithelization and neovascularization scores were similar in the MCP-oral and MCP-topical treatment groups. Oxidative stress must be determined in acute and chronic inflammatory conditions such as wound healing and degenerative processes. Accordingly, to further examine the potential effect of MCP on wound repair in different laboratory animals, future studies should take into account blood and tissue chemistry variables and should associate any changes with oxidative status and tissue regeneration ability.

## References

- Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros SM, Miller JJR et al, 2007: Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair Regen*, 15 (1), 80-86.
- Agren MS, Mertz PM, Franzen, L, 1997: A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full thickness wounds in pigs. *J Am Acad Dermatol*, 36, 53-58.
- Ahmad Z, Zamhuri KF, Yaacob A, Siong CH, Selvarajah M et al, 2012: In vitro anti-diabetic activities and chemical analysis of polypeptide-k and oil isolated from seeds of *Momordica charantia* (bitter gourd). *Molecules*, 17(8), 9631-9640.
- Anderson DM, White RAS, 2000: Ischemic bandage injuries: A case series and review of the literature. *Vet Surg*, 29(6), 488-498.
- Atayoglu AT, Silici S, 2016: Preliminary Study on Wound Healing Activity of Propolis in Albino Rats. *International Journal of Innovative Research in Medical Sciences*, 1(7), 2455-8737.
- Basim E, Basim H, Özcan M, 2006: Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J Food Eng*, 77(4), 992-996.
- Baum CL, Arpey CJ, 2005: Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31, 674-686.
- Das DR, Sachan AK, Imtiyaz M, Shuaib M, 2015: *Momordica charantia* as a potential medicinal herb: an overview. *J. Med. Plants Stud*, 23(25), 23-26.
- Diegelmann RF, Evans MC, 2004: Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front in Biosci*, 9(1), 283-289.
- Grover JK, Yadav SP, 2004: Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*, 93, 123-132.
- Gu Y, Kaida T, Kaida K, 2005: Immunostimulating and Antitumor Effects by *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat. *Int J Med Mushrooms*, 7(3), 406.
- Hussan F, Teoh SL, Muhamad N, Mazlan M, Latiff AA, 2014: *Momordica charantia* ointment accelerates diabetic wound healing and enhances transforming growth factor- $\beta$  expression. *J Wound Care*, 23(8), 400-407.
- Keast D. Ve Orsted H, 2000: The basic principles of wound healing. *Ostomy Wound Manag*, 46(11), 16.
- Keskin N, Hazır S, Baser KHC, Kurkcuoglu M, 2001: Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch*, 56(11-12), 1112-1115.
- Kim J, Lee CM, 2017: Wound healing potential of a polyvinyl alcohol-blended pectin hydrogel containing *Hippophae rhamnoides* L. extract in a rat model. *Int J Biol Macromol*, 99, 586-593.
- Kim YS, Cho IH, Jeong MJ, Jeong SJ, Nah SY et al, 2011: Therapeutic effect of total ginseng saponin on skin wound healing. *J Ginseng Res*, 35(3), 360-367.
- Koc AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbaş A, Çankaya S, 2005: Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses*, 48(3), 205-210.
- Lemo N, Marignac G, Reyes-Gomez E, Lilin T, Crosaz O et al, 2010: Cutaneous reepithelialization and wound contraction after utaneous reepithelialization and wound contraction after skin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and kin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and remodelling index. *Vet Arh*, 80(5), 637-652.
- Mahmood AA, Mariod AA, Abdelwahab SI, Ismail S, Al-Bayaty F, 2010: Potential activity of ethanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) rhizomes extract in accelerating wound healing in rats. *J Med Plant Res*, 4(15), 1570-1576.

- Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M et al, 1997: Evaluation of propolis. Part I: evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull*, 20(5), 496-501.
- Ono T, Tsuji T, Sakai M, Yukizaki C, Ino H et al, 2009: Induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts and their proliferation by the extract of bitter melon pulp. *Cytokine*, 46(1), 119-126.
- Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A, 2018: Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother*, 98, 469-483.
- Otranto M, Do Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A, 2010: Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, 18(6), 629-636.
- Pillai SI, Palsamy P, Subramanian S, Kandaswamy M, 2010: Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharm Biol*, 48(11), 1198-1206.
- Ragab AI, Mekkawy MM, El-Gamil A, Mohanny KM, 2015: Effect of Propolis Dressing Technique on the Healing of Septic Diabetic Foot Ulcers. *IOSR Journal of Nursing and Health Science (IOSR-JNHS4)*, 4, 33-52.
- Ramos AFN, Miranda JL. 2007: Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 13(4), 697-710.
- Sahu RK, Jain A, Nayak S. 2011: *Momordica charantia* Linn.: a mini review. *Int J Biomed Res*, 11 (2), 579-587.
- Sankaranarayanan J, Jolly CI, 1993: Phytochemical, antibacterial and pharmacological investigations on *Momordica charantia* Linn. *Emblica officinalis* Gaertn. and *Curcuma longa* Linn. *Indian J Pharm Sci*, 55(1), 6-13.
- Singla V, Saini A, Joshi B, Rana AC, 2012: Emulgel: A new platform for topical drug delivery. *Int J Pharma Bio Sci*, 3(1), 485-498.
- Simões LMC, Gregório LE, Da Silva Filho AA, de Souza ML, Azzolini AECS et al, 2004: Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol*, 94(1), 59-65.
- Singh R, Garcia-Gomez I, Gudehithlu KP, Singh AK, 2017: Bitter Melon Extract Promotes Granulation Tissue Growth and Angiogenesis in the Diabetic Wound. *Adv Skin Wound Care*, 30(1), 16-26.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V, 2009: The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.*, 37: 1528-1542.
- Wang, L. Chen, W. Wu, Y. Long, R. Wang, 2008: Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can J Physiol Pharmacol*, 86 (5), 279-287.
- Zhang QC, 1992: Preliminary report on the use of *Momordica charantia* extract by HIV patients. *IntJNM*, 3, 65-69.
- \*Corresponding author:** Elif DOĞAN  
Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Surgery, Kastamonu, Turkey.  
**e-mail:** elifdogan@kastamonu.edu.tr

## Şanlıurfa İlinde Isı Stresindeki İneklerde Bazı Ovulasyon Senkronizasyon Yöntemlerinin Gebelik Oranlarına Etkisi\*

Zekiye ÇENET<sup>1,a</sup>, Ömer KORKMAZ<sup>1,b,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-0708-844X, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-5179-2181

Tarihi: 15.04.2020

Kabul Tarihi: 16.06.2020

**Özet:** Yaz aylarında, suni tohumlama uygulanan süt sığırlarında, ısı stresinden kaynaklı düşük gebelik oranları gözlenmektedir. Sunulan çalışmada amaç, ısı stresine maruz kalan ineklerde, bazı senkronizasyon yöntemlerinden en yüksek gebelik oranına ulaşılabilecek yöntemleri belirlemektir. Çalışma materyalini, Şanlıurfa ilindeki bir süt sığırı işletmesinde yaşları 3-7 arasında değişen, en az bir doğum yapmış toplam 112 Holstein-Friesian ırkı inek oluşturdu. İşletmede ısı stresine karşı alınmış herhangi bir tedbir mevcut değildi. Ovulasyon senkronizasyon protokolleri uygulanacak çalışma grupları Grup I (Ovynsch yöntemi), II (Cosynch yöntemi) ve III (Ovynsch + progesteron yöntemi)'e dahil edilecek inekler her grupta 30 adet olmak üzere rastgele seçildi ve protokol kapsamında suni tohumlama uygulandı. Kontrol grubu olan Grup IV'e ait inekler ise çalışmanın yapıldığı dönemde herhangi bir senkronizasyon yöntemi uygulamadan, östrüs belirtileri gözlemlenen ineklerden (n=22) seçildi ve östrüs gösterdikleri gün suni tohumlama işlemi uygulandı. Çalışmanın yapıldığı Şanlıurfa ilinde, Temmuz-Ağustos aylarında yapılan sıcaklık nem indeksi hesaplamasına bakıldığında süt sığırı işletmeleri açısından ciddi bir ısı stresinin mevcut olduğu görüldü. Ovulasyon senkronizasyon yöntemlerinin kullanıldığı ilk üç grupta östrüs belirtilerinin gözlenmesi (Grup I de %36,67, Grup II'de %16,67 ve Grup III'de %40) açısından farkın anlamlı olduğu görüldü (p<0.001). Tohumlama sonrası 30. günde yapılan transrektal ultrasonografik gebelik muayenelerinin sonucunda gebelik oranları gruplar arasında (%23,33, %20, %26,67 ve %22,73) bir fark olmadığı belirlendi (p>0.05). Sonuç olarak, Şanlıurfa ve çevresinde süt sığırcılığı işletmelerinin yaz aylarında ciddi derecede ısı stresine maruz kaldığı görüldü ve reproduktif açıdan verim elde etmek için ısı stresinde ovulasyon senkronizasyon yöntemlerinin kullanılabilir olduğu kanaati oluştu.

**Anahtar Kelimeler:** Süt sığırcılığı, Isı stresi, Ovulasyon senkronizasyonu.

### The Effect of Different Ovulation Synchronization Methods on Fertility in Cows with Heat Stress in Şanlıurfa Province

**Abstract:** Low pregnancy rates due to heat stress are observed in dairy cattle in which artificial insemination is applied in summer. The aim of this study is to determine the method for reaching the highest pregnancy rate in some cows subjected to heat stress. The study material consists of 112 Holstein-Friesian cows with a minimum age of 3 to 7 in a dairy cattle farm in Şanlıurfa. No measures were taken against heat stress in the enterprise previously. The groups (n=30) were study group I (Ovynsch), II (Cosynch) and III (Ovynsch + progesterone). In the control group, cows belonging to group IV were not given any synchronization method during the study period, and the estrus signs were determined from the cows (n=22). When the temperature humidity index was calculated in Şanlıurfa, July-August, it was seen that there was a severe temperature stress in the dairy cattle farms. The difference between the first three groups using ovulation synchronization methods was statistically significant (p<0.001) (36.67% in Group I, 16.67% in Group II and 40% in Group III). In the results of transrectal ultrasonographic pregnancy examinations performed 30 days after insemination, there was no difference between the groups (23.33%, 20%, 26.67% and 22.73%). In conclusion, dairy cattle farms in Şanlıurfa and Turkey were exposed to severe heat stress in the summer months and it was concluded that ovulation synchronization methods could be used in heat stress in order to obtain reproductive efficiency.

**Keywords:** Dairy cattle, Heat stress, Ovulation synchronization.

### Giriş

Süt sığırı işletmelerinde ısı stresi, genel olarak termoregülasyonda bir sorun olduğunda ortaya çıkmaktadır. Yüksek süt verimli hayvanlar, ısı stresinden daha çok etkilenirler (Bademkiran ve Güvenç, 2005; Koç ve Uğurlu, 2019).

Isı stresinin hayvanlarda GnRH'ı (Gonadotropin saliverici hormon) engelleyerek, LH (Lüteinleştirici hormon) sekresyonunu düşüren kortikosteroid

salınmasına neden olabileceği şeklinde açıklanmaktadır (De Rensis ve Scaramuzzi, 2003). Yüksek kortizol seviyesi, ovulasyonun gecikmesine veya anovulasyona neden olmaktadır (Dobson ve ark., 2001). Isı stresi sebebiyle düşük LH salınımında gelişen dominant follikülden östradiol salınımının azalmasına bağlı, östrüs süresi ve östrusun klinik

bulguları da azalmaktadır (De Rensis ve Scaramuzzi, 2003; Sönmez ve ark., 2005).

Isı stresinin fertilité üzerindeki olumsuz etkisini azaltmak için gölgelik, yağmurlama, fan ve klima sistemleri ile sıcaklık kontrolü (West, 2003), vitamin ve mineral ilaveleri (De Rensis ve Scaramuzzi, 2003), östrüs ve ovulasyon senkronizasyonu ile sabit zamanlı tohumlama uygulamaları önerilmektedir (Peralta ve ark., 2005).

Sütçü sığırlarda ısı stresinin ifade edilmesinde sıcaklık nem indeksi (SNİ) diye adlandırılan bir indeks değeri kullanılmaktadır. Hayvanlar için sıcaklık nötr alanının üst değeri 70 iken,  $70 \leq SNİ < 74$  arası orta derece ısı stresi için,  $74 \leq SNİ < 77$  arası önlem alınması gereken ısı stresi için ve ciddi derecedeki ısı stresi için de  $SNİ \geq 77$  şeklinde kabul edilmektedir (Koç ve Uğurlu, 2019).

Sunulan çalışmada amaç, Şanlıurfa ilinde ısı stresine maruz kalan ineklere ısı stresinin olumsuz özelliklerinden, östrüs tespit güçlüğüne bertaraf edip sabit zamanlı tohumlamaya olanak sağlayan bazı senkronizasyon yöntemlerinden en yüksek gebelik oranına ulaşılan yöntemini belirlemektir.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK)'nun kararı (2018/002/01-08) ile yürütüldü.

Çalışma materyalini, Şanlıurfa ilindeki bir süt ineği işletmesinde 3-7 yaşlarında, en az bir doğum yapmış, vücut kondisyon skorları 2.75-3.25 arasında değişen, son buzağılama tarihinden en az 50 gün geçmiş, toplam 112 Holstein-Friesian ırkı inekler oluşturdu. İneklerin geçmiş fertilité kayıtlarına bakılarak daha önce herhangi bir dölverimi problemi olmayan inekler çalışmaya dahil edildi. Çalışma, Şanlıurfa ilinde ( $38.7955^{\circ}E$  ve  $37.1674^{\circ}N$ ) sıcaklıkların en yüksek olduğu Temmuz-Ağustos ayları içinde gerçekleştirildi ve işletmede ısı stresine karşı alınmış herhangi bir tedbir mevcut değildi. Bu aylara ait meteoroloji verileri, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Şanlıurfa İl Müdürlüğünden temin edildi.

Çalışmanın yapıldığı döneme ait SNİ değeri, Mader ve ark. (2006)'nın bildirdiği gibi kuru termometre sıcaklığı ve bağıl nem verileri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Sıcaklık Nem İndeksi= $(0.8 \times \text{Kuru Termometre Sıcaklığı}) + [(\text{Bağıl Nem}/100) \times (\text{Kuru Termometre Sıcaklığı} - 14.4)] + 46.4$

Çalışma grupları olan, ovulasyon senkronizasyonu uygulanacak, Grup I, II ve III'e 30'ar inek rastgele seçildi. Kontrol grubu olan Grup IV'e (n=22) ait inekler ise çalışmanın yapıldığı dönemde herhangi bir senkronizasyon yöntemi uygulanmamış, sabah ve akşam yapılan gözlemlerde

spontan östrüs belirtileri (birbiri üzerine atlama, çara akıntısı, hareketlilikte artış, vulvada ödem) gözlemlenen ineklerden seçildi.

Senkronizasyon yöntemlerinde kullanılacak hormon preparatları olarak GnRH analogu (gonadorelin diasetat tetrahidrat), 2 ml (100 mcg) intramuskuler (im) (OVARELİN, Ceva), PGF2 $\alpha$  (dinoprost) 5 ml (25mg) IM yolla (ENZOPROST-T, Ceva) ve progesteron ise 1.55 gr, (PRID DELTA, Ceva) 7 gün boyunca intravaginal olarak uygulandı.

Grup I (n=30): Bu gruptaki inekler Ovsynch yöntemi kapsamında, 0. gün GnRH analogu uygulamasını takiben 7 gün sonra PGF2 $\alpha$  enjekte edildi. Elli altı saat sonra, 9. Gün tekrar GnRH analogu enjekte edildi ve uygulamayı takip eden 16-24 saatler arasında planlı suni tohumlama yapıldı.

Grup II (n=30): Bu gruptaki inekler Cosynch yöntemine tabi tutuldu. Bu yöntemde, 0. gün GnRH analogu uygulandı. 7. gün PGF2 $\alpha$  analogu, 9. gün tekrar GnRH analogu ve uygulama ile beraber suni tohumlama yapıldı.

Grup III (n=30): Bu gruptaki inekler ise Ovsynch+Progesteron yöntemine tabi tutuldu. Bu uygulamada 0. gün GnRH analogu uygulandığı gün 7 gün boyunca kalacak, intravaginal progesteron içeren gereç yerleştirildi. Yedinci gün PGF2 $\alpha$  analogu uygulandı ve progesteron içeren gereç çıkartıldı. 56 saat sonra GnRH analogu uygulamasını takiben 16-24 saat içinde ineklere suni tohumlama yapıldı.

Senkronizasyon uygulanan çalışma gruplarında (Grup I, II ve III) ve spontan östrüs gösteren Grup IV'deki hayvanların suni tohumlama uygulama anında B mod, lineer problu ultrasonografi cihazı (SIUI, CTS-800, linear prob, 5 MHZ, Guangdong, China) ile follikül çapları ölçüldü ve kaydedildi. Tüm gruplardaki hayvanların gebelik muayeneleri, suni tohumlama uygulamaları sonrası 30. günde transrektal ultrasonografi yöntemiyle yapıldı.

Sunulan çalışmada istatistik analizleri SPSS (Statistical Package for Social Science) 22.0 paket programında yapıldı. Elde edilen sonuçlarda farklılığın anlamlılığı  $p < 0.05$  değerler için kabul edildi. Öncelikle gruplardaki veriler Komorrov-Simironov testi ile homojenitesi değerlendirildi ve verilerin ortalama ve standart sapma değerleri, tanımlayıcı istatistik ile belirlendi. Gruplarda follikül çap değeri arasında farklılığın anlamlılığı Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı. Gebelik oranlarının değerlendirilmesinde ise Pearson chi kare testi uygulandı.

## Bulgular

Çalışmanın yapıldığı 2018 yılı Temmuz-Ağustos ayları sıcaklık ve bağıl nem oranına göre yapılan SNİ

değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Hesap edilen bu değerler çalışmanın yapıldığı aylarda SNİ

**Tablo 1.** Şanlıurfa ili 2018 yılı Temmuz ve Ağustos aylarına ait meteoroloji verileri

TEMMUZ	Ort. sıcaklık	Ort. BN	SNİ
	31.9 °C	33.1	77
	Ort. maksimum sıcaklık	Ort. maksimum BN	SNİ
	39.3 °C	51.7	90
AĞUSTOS	Ort. sıcaklık	Ort. BN.	SNİ
	32.3 °C	36.3	80
	Ort. maksimum sıcaklık	Ort. maksimum BN	SNİ
	39.2°C	56.3	91

Ort: ortalama, BN: Bağıl Nem, SNİ: Sıcaklık Nem İndeksi,

değerlerinin ciddi ve çok tehlikeli bir sınırdaki olduğunu göstermektedir.

Gruplar arasındaki yaş ve postpartum gün ortalaması tohumlama anındaki en büyük ortalama ovaryum follikül çapı, östrüs belirleme oranları, 30, 45 ve 60. günlerdeki gebelik durumları Tablo 2’de verilmiştir.

Tüm gruplarda tohumlama anındaki en büyük ortalama dominant follikül çapı grup IV’de (11.60±1.34 mm) ölçüldü. Bu değeri grup III (10.96±2.23 mm) ve grup I (10.77±2.02 mm) takip ederken en düşük dominant follikül çapı 9.42±1.69 mm ile grup II’de kaydedildi. Tohumlama anında gruplar arası follikül çapları istatistiksel olarak anlamlı (p<0.005) bulundu.

**Tablo 2.** Gruplar arası yaş, postpartum gün, folikül çapı, östrüs gösterme ve gebelik değerleri.

	n	Yaş (Yıl)	Postpartum (Gün)	Folikül Çapı (mm)	Östrüs (sayı)	Gebelik (%)
Grup I	30	3.9±0.7	84.66±8.15	10.77±2.02 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	7 (23.33)
Grup II	30	3.8±0.7	85.26±6.98	9.42±1.69 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	6 (20)
Grup III	30	3.9±0.8	83,96±7.29	10.96±2.23 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	8 (26.67)
Grup IV	22	4.2±0.7	94.86±8.40	11.60±1.34 <sup>c</sup>	22 <sup>c</sup>	5 (22.73)
P				P<0.05	P<0.001	P>0.05

<sup>a,b,c</sup>: Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

Sabit zamanlı suni tohumlama için ovulasyon senkronizasyon yöntemlerinin kullanıldığı ilk üç grupta östrüs bulgularının gözlemlenmesi arasında farklılığın anlamlı olduğu (p<0.001) belirlendi.

Gruplar arasındaki gebelik oranları sırasıyla %23.33, %20, %26.67 ve %22.73 olarak kaydedilirken gebelik oranları açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı.

## Tartışma ve Sonuç

Ovulasyon senkronizasyon yöntemlerin başarısını hayvanın yaşı, laktasyon sayısı, uygulama esnasında sıklık dönemi ve ovaryum sorunları, VKS’nin düşük olması (2.5 ve altı) etkileyebilmektedirler (Moreira ve ark., 2000). Bu çalışmada anılan faktörler dikkate alınarak hayvan seçimleri yapılmıştır. Ayrıca ısı stresine maruz kalan süt ineklerinde laktasyonun erken dönemlerinde,

enerji metabolizmalarındaki değişikliklerden dolayı, ısı stresinin olumsuz özelliklerinden daha fazla etkilendikleri bildirilmektedir (Turk ve ark., 2020). Çalışmamızda seçilen ineklerin ısı stresinin gerçek olumsuz etkileri gölgelenmesin diye enerji metabolizmalarının kısmen düzene girdiği ve bir örnek olduğu doğumdan sonra en az 50 gün geçmiş olmasına dikkat edilmiştir.

İlhan (2018), Temmuz ve Ağustos aylarında günlük ortalama SNİ değerlerinin, Marmara Bölgesi’nin kuzey, doğu ve güneydoğu kesimleri dışında kalan kısımlarında kritik eşik değerin üzerinde olduğunu belirtmektedir. Kibar ve ark. (2018), Siirt il merkezi ile ilçelerinde Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında SNİ değerlerinin eşik değerin üzerine çıktığını bildirmektedir. Sunulan çalışmada, Şanlıurfa ilinde benzer olarak Temmuz ve Ağustos aylarında SNİ değerinin kritik eşik değerin üstünde olduğu hatta ortalama bağıl nem ve kuru

termometre sıcaklığı ile hesap edilen SNİ değerlerinde bile ciddi değer olan 77 yi aştığı ölçülmüştür. Çalışmamızda bu ölçümün maksimum sıcaklık ve maksimum bağıl nemde 91 gibi çok ciddi SNİ değerine ulaştığı hesaplanmaktadır. Şanlıurfa ili için Temmuz ve Ağustos aylarında ölçülen yüksek SNİ değerinin sebebi olarak Yeşilata ve ark. (2004)'nın dikkat çektiği Atatürk Baraj Gölünün faaliyete geçtiği yıldan itibaren görülen iklim değişikliği ve bağıl nem ve maksimum sıcaklık derecelerindeki artış ve Çağlak ve ark. (2016)'nın Şanlıurfa ili için detaylı bir şekilde analiz ettikleri yerel coğrafi şartların şekillendirdiği, yaz aylarının çok sıcak geçtiği, karasal ikliminin getirisi olduğu kanaatindeyiz.

Yaslıoğlu ve İlhan (2016), Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerinde süt veriminde en fazla kaybın Temmuz ve Ağustos aylarında olduğunu bildirmektedir. Duru (2018), Bursa ili için, SNİ değeri 65 olduğunda Holstein ineklerinin süt veriminin düşmeye başladığını dikkat çekerek süt veriminin geri döndürülemez bir şekilde azalmaya başladığı eşik değerinin 70 olduğunu belirtmektedir. Khan ve ark. (2013), süt sığırlarındaki gebelik oranının SNİ eşik değerine (72) yakın olan iklim şartlarında, %32.60, ısı stresinin görüldüğü şartlarda ise %20.50 olduğunu bildirmektedir. Çalışmada Şanlıurfa ilinde SNİ'nin 77 ve üstü olarak hesaplandığı Temmuz ve Ağustos aylarında dölveriminin göstergesi olan gebelik oranlarına bakıldığında gruplar arasında %20-26.67 arasındaki değerlerde olduğu görülmektedir. Çalışmamızda yüksek SNİ değerlerinde elde ettiğimiz gebelik oranlarının Khan ve ark. (2013)'nin SNİ 81-82 arasında hesapladıkları dönemde bildirdiği ortalama değerle bazı gruplar paralel iken bazı gruplardan daha yüksek olmasının sebebi olarak gruplar arasında kullanılan senkronizasyon protokol farklılığından kaynaklandığı düşünüldü.

Senkronizasyon protokollerinden Ovsynch'e göre Co-synch yönteminde ineklerdeki gebelik oranının daha düşük olduğu (Geary ve Whittier, 1998), progesteron destekli uygulamaların ise Ovsynch, Cosynch ve Heatsynch'den elde edilen gebeliği daha iyi duruma gelmesi amacıyla, başvurulan bir protokol olduğu bildirilmektedir (Xu ve ark., 2000). Sunulan çalışmada bu bilgiye paralel olarak ısı stresine maruz kalan ineklerde en düşük gebelik oranının cosynch protokolünde (%20), en yüksek gebeliğin ise (%26.67) progesteron destekli senkronizasyon protokolünde gözlenmiştir. Herhangi bir protokol uygulanmayan kontrol grubunda gebelik oranı (%22.73), Khan ve ark. (2013)'nin belirttiği değere yakın olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada gebelik oranlarının kısmen düşük olmasının sebebi olarak Moreira ve ark. (2000)'nin

bildirdiği gibi senkronizasyon protokollerinde uygulanan ilk GnRH enjeksiyonun proöstrüs, metöstrüs ve geç diöstrüs evrelerine denk gelebilmesi sonucu oluşan ovulasyon oranlarında azalmadan kaynaklı olabileceği ancak asıl sebebin çalışma hipotezi gereği çalışmanın yapıldığı dönemde var olan yüksek SNİ değerinden kaynaklı ısı stresinin olumsuz özellikleri olduğu kanaatine varıldı.

Çalışma kapsamında östrüs belirtilerinin çok zor gözleendiği ısı stresi etkisinde bile sürü içinde rastgele 90 inekte senkronizasyon yöntemlerinin uygulandığı çalışma gruplarında suni tohumlama uygulaması için protokollere alınabilmiş ve sonunda 21 inek gebe kalmıştır. Isı stresinin görüldüğü bu iki aylık süreç boyunca ancak 22 inekte östrüs gözlenerek (kontrol grubu) suni tohumlama uygulanmış ve sadece 5 inekte gebelik elde edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı süt sığırları işletmesinde reproduktif açıdan sessiz bir dönem olan yaz aylarında ovulasyon senkronizasyon yöntemleri ile suni tohumlama ve gebelik imkânı sağlanabilmektedir. Çalışma bu açıdan ele alındığında, ekonomik olarak fırsat kaybı gözetildiğinde, ısı stresi etkisi altında süt sığırları işletmelerinde, senkronizasyon uygulamalarının kazançlı bir yaklaşım olacağı kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, Şanlıurfa ve çevresinde süt sığırcılığının işletmelerinde yaz aylarında ciddi derecede ısı stresi yaşandığı ölçülmüştür. Bu aylarda ısı stresinin ekonomik kayba yol açan düşük gebelik oranlarının sebebi olan östrüs tespit güçlüğünü bertaraf edecek sabit zamanlı tohumlama imkânı sağlayan ovsynch, cosynch ve en yüksek gebelik oranına ulaştığımız progesteron destekli ovsynch protokollerinin kullanılabilir olduğu kanaati uyanmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma, Harran Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi Tarafından 18093 proje numarası yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Bademkiran S, Güvenç K, 2005: Sütçü sığırlarda sıcaklık stresinin döl verimi üzerine etkisi. *İÜ Vet Fak Derg*, 2, 53-59.
- Çağlak S, Özlü T, Gündüz S, 2016: Şanlıurfa ilinin iklim özelliklerinin enterpolasyon teknikleri ile analizi. *JISR*, 9(45), 360-372.
- De Rensis F, Scaramuzzi RJ, 2003: Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. *Theriogenology*, 60, 1139-1151.



- Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR, 2001: Is stres really all that important. *Theriogenology*, 55(1), 65-73.
- Duru S, 2018: Determination of starting level of heat stress on daily milk yield in Holstein cows in Bursa city of Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 65, 193-198.
- Geary TW, Whittier JC, 1998: Effect of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or Co-Synch protocol in beef cows. *Prof Anim Sci*, 14, 217-220.
- İlhan H, 2018: Marmara bölgesi süt sığırcılığı işletmelerinin sıcaklık-nem göstergesi kullanılarak değerlendirilmesi ve yapısal önlemler. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Khan FA, Prasad S, Gupta HP, 2013: Effect of heat stres on pregnancy rates of crossbred dairy cattle in Terai region of Uttarakhnad, India. *Asian Pac J Reprod*, 2: 277-279.
- Kibar M, Yılmaz A, Bakır G, 2018: Sıcaklık nem indeks değerlerinin süt sığırcılığı açısından değerlendirilmesi: Siirt ili örneği. *Turk J Agric Res*, 5(1): 45-50.
- Koç HU, Uğurlu M, 2019: Süt Sığırlarında Isı Stresinin Verim Özellikleri Üzerine Etkisi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 59(1), 30-35.
- Mader TL, Davis MS, Brown-Brandl T, 2006: Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J Anim Sci*, 84, 712-719.
- Moreira F, Risco C, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, DeLorenzo M and Thatcher WW, 2000: Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, 53, 1305-1319.
- Peralta OA, Pearson RE, Nebel RL, 2005: Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. *Anim Reprod Sci*, 88, 155-167.
- Sönmez M, Demirci E, Türk G, Gür S, 2005: Effect of season on some fertility parameters of dairy and beef cows in Elazığ province. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 821-828.
- Turk R, Rosic N, Vince S, Perkov S, Samarddzija M, Beer-Ljubic B, Robic M, 2020: The influence of heat stress on energy metabolism in Simmental dairy cows during the periparturient period. *Vet Arhiv*, 90(1), 1-10.
- West JW, 2003: Effects of heat stres on production in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 86, 2131-2144.
- Xu ZZ, Burton LJ, McDougall S, Jolly PD, 2000: Treatment of noncyclic lactating dairy cows with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, prostaglandin F2 $\alpha$  and estradiol. *J Dairy Sci*, 83, 464-470.
- Yaslıoğlu E, İlhan H, 2016: Güney Marmara süt sığırcılığı yetiştiriciliğinin ısı stresi yönünden değerlendirilmesi. *JOTAF*, 13(4), 12-19.
- Yeşilata B, Bulut H, Yeşilnacar Mİ, 2004: Gap Bölgesindeki sıcaklık ve nem parametrelerindeki baraj gölü kaynaklı değişim trendinin araştırılması. *Tesisat Mühendisliği Dergisi*, 83, 21-31.
- \*Bu araştırmanın "Isı Stresindeki İneklerde Farklı Ovulasyon Senkronizasyon Yöntemlerinin Fertiliteye Etkisi" başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir ve VIII. National & II. International Congress of Turkish Society of Veterinary Gynaecology (10 - 13 October 2019 / Antalya – TURKEY) kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.
- \*\*Yazışma Adresi: Ömer KORKMAZ**  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.  
**e-mail:** omerkorkmaz1978@gmail.com

## Sığır Kas ve Böbrek Dokularında Antibiyotik Kalıntılarının Araştırılması\*

Semra GÜRBÜZ<sup>1,a,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Mardin Artuklu Üniversitesi Turizm Fakültesi, Mardin, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-7099-0308

Tarihi: 19.04.2020

Kabul Tarihi: 17.06.2020

**Özet:** Bu çalışmada sığır kas ve böbrek dokularında antibiyotik varlığının araştırılması amaçlandı. Çalışmada, Ankara'daki mezbahalarda kesimi yapılan 100 adet sığırın kas ve böbrek dokusu ile parekende satış yerlerinden alınan 100 adet sığır kas dokusu olmak üzere toplam 300 örnek test materyali olarak kullanıldı. Örnekler antibiyotik kalıntılarının tespiti için  $10^7$  kob/ml *Bacillus subtilis* BGA spor solusyonunun ilave edildiği Üç Plak Test yöntemi kullanılarak test edildi. İncelenen 300 örneğin 5'i kas ve 2'si böbrek dokusu olmak üzere 7 (%2.3)'sinde antibiyotik kalıntısı bulunduğu, pozitif bulunan 4 kas örneğinin birden fazla pH değerinde inhibisyon zonu oluşturduğu saptandı. Böbrek örneklerinden 4 (%1.3)'ü şüpheli olarak değerlendirilirken, 289 (%96.4) örnekte antibiyotik varlığı tespit edilmedi. Tüketime sunulan hayvansal dokularda antibiyotik kalıntıları bulunması önemli sağlık problemlerine neden olabileceği için hayvan yetiştiricilerinin bilinç düzeyinin artırılmasına yönelik çalışmaların etkin ve devamlı yapılmasının faydalı olacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç kalıntıları, Veteriner ilaçları, Antibakteriyel ajanlar, Sığır kas dokusu, Sığır böbreği.

### Investigation of Antibiotic Residues in Muscle and Kidney Tissues of Cattle

**Abstract:** This study aimed to investigate the presence of antibiotics in cattle muscle and kidney tissues. In the study, a total of 300 samples were used as test materials, including the muscle and kidney tissues of 100 cattle slaughtered in slaughterhouses and 100 cattle muscle tissues taken from retail stores in Ankara. Samples were tested using the Three Plate Test method in which  $10^7$  cfu / ml *Bacillus subtilis* BGA spore solution was added to detect antibiotic residues. It was determined that 7 (2.3%) of the 300 samples examined, 5 of which were muscle tissue and 2 of which were kidney tissue, had antibiotic residues, and 4 positive muscle samples formed an inhibition zone at more than one pH value. While 4 (1.3%) of the kidney samples were considered suspicious, the presence of antibiotics was not detected in 289 (96.4%) samples. Since the presence of antibiotic residues in animal tissues offered for consumption may cause important health problems, it is thought that it will be beneficial to carry out training aimed at increasing awareness of animal breeders effectively and continuously.

**Keywords:** Drug residues; Veterinary drugs, Anti-bacterial agents, Cattle muscle tissue, Cattle kidney

### Giriş

Antibiyotikler, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyöz hastalıkların tedavisi ile hayvan yetiştiriciliğinde metafilaktik, profilaktik ve gelişmeyi destekleyici olarak düşük dozlarda yemlere ilave edilerek yaygın olarak kullanılmaktadır (Chafer-Pericas ve ark., 2010; Founou ve ark., 2016; Singh ve ark., 2014; Yıbar ve Soyutemiz, 2013).

Kasaplık hayvanlarda kullanılan antibiyotikler hayvansal ürünlerde farklı seviyelerde kalıntı oluşmasına neden olabilmektedir. Antibiyotik kalıntılarının; ilacın yanlış kullanımı, ilaç atım süresinin takip edilmemesi, yasa dışı kullanım, yetkisiz kişilerce bilinçsiz kullanım, ilaç kullanılan hayvana ilişkin kayıtların tutulmaması, uzun süre etkili ve salınımı yavaş olan ilaçların kullanılması, hayvanın biyolojik özellikleri vb. kaynaklı olabildiği bildirilmektedir (Acaröz ve ark., 2016; Aydın ve Yılmaz Aksu, 2015; Bayou ve Haile, 2017; Beyene, 2016).

Antibiyotik kalıntısı bulunan gıdalar, tüketicilerde alerjik reaksiyonlar ve çeşitli toksik

etkilere, mide bağırsak sistemindeki yararlı mikroorganizmaların yok olmasına neden olabildiği gibi gıda endüstrisindeki fermente ürünlerin yapımında starter kültürlerin aktivitesini olumsuz yönde etkileyerek teknolojik problemlere ve ekonomik kayıplara da neden olmaktadır (Jabbar ve Ur-Rehman, 2013; Prajwal ve ark., 2017; Sanz ve ark., 2015). Çiftlik hayvanlarında metafilaktik, profilaktik ve gelişmeyi destekleyici olarak antibiyotik kullanımından kaynaklanabilen, antibiyotiklere dirençli patojen bakteriler, gıda üretim zinciri boyunca kolaylıkla yayılabilmekte ve insanlarda enfeksiyona neden olabilmektedir (Beyene, 2016; Founou ve ark., 2016; Gürbüz ve ark., 2018). Bu durum antibiyotiklerin hastalıkların tedavisindeki etkinliğini tehdit ederek çok ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (Kantiani ve ark., 2009).

Gıdalarda antibiyotik kalıntılarının taranmasına yönelik çalışmalar 1970'li yıllarda Avrupa'da mikrobiyal inhibisyon testleri kullanılarak

başlamıştır (Vishnuraj ve ark., 2016). Antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde kullanılan analitik metodlar tarama ve konfirmasyon testlerinden oluşmaktadır (Chafer-Pericas ve ark., 2010). Almanya Sağlık Teşkilatınca uygulanan Üç Plak Testi, Avrupa Birliği Dört Plak Testi, Antibiyotik Kalıntıları için Tarama Testi vb. mikrobiyal testler genellikle tarama seviyesinde kullanılır ve numunelerde bulunan kalıntılar tarafından, besiyerine eklenen bakterinin büyümesinin inhibisyonu prensibine dayanır (Pikkemaat, 2009; Sanz ve ark., 2015). Bu çalışmada kullanılan Üç Plak Testinin üç değişik pH ortamında uygulanarak optimal antibakteriyel etkinliğin açığa çıkmasına olanak verdiği ve testin duyarlılığının, yaygın olarak kullanılmakta olan diğer testlere göre eşit düzeyde veya yüksek bulunduğu bildirilmektedir (Schramm ve ark., 1994). Yalancı pozitiflik alınabileceği bildirilmekle birlikte yalancı negatiflik alınabileceğine dair bir kaynağa rastlanılmamıştır (Zamaro ve Yabut, 1989).

Bu çalışmada Ankara'daki mezbahalardan alınan sığır kas ve böbrek dokuları ile parakende satış yerlerinden alınan sığır kas dokularında antibiyotik varlığının Üç Plak Testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Çalışma materyali:** Bu çalışmada, Ankara'daki mezbahalarda kesilen 100 sığira ait kas ve böbrek dokusu örnekleri ile parakende satış yerlerinden satın alınan 100 sığır kas dokusu örneği olmak üzere toplam 300 örnek kullanıldı. Kas örnekleri gluteal kasların bulunduğu bölgeden, böbrek örnekleri ise 1 adet tam böbrek olarak alındı. Toplanan örnekler konteyner ile soğuk şartlarda laboratuvara ulaştırıldı ve buzdolabında saklanarak 2 gün içerisinde test edildi.

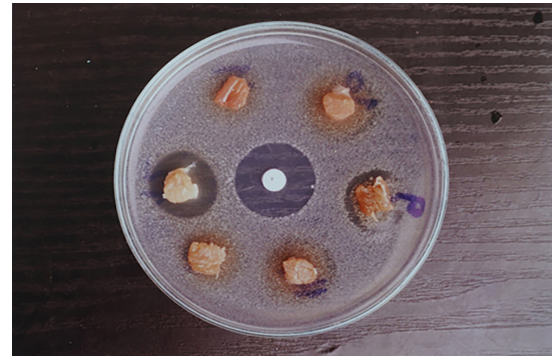
**Üç Plak Testi ile antibiyotik varlığının saptanması:** Örneklerde antibiyotik varlığının saptanmasında mikrobiyolojik bir yöntem olan Üç Plak Testi uygulandı (Anonim, 1986). Üç ayrı erlenmayerde hazırlanan Standart II nutrient agar (MERCK 1.07883) üzerine % 0.1 oranında  $KH_2PO_4$  ilave edildi. Takiben 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak besiyerinin pH'sı 6.0, 7.2 ve 8.0'e ayarlandı. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C'ye soğutulan besiyerinin 500 ml'sine 0.5 ml olacak şekilde *Bacillus subtilis* BGA suşunun  $10^7$  kob/ml spor içeren solüsyonundan (MERCK 1.10649) eklendi. Besiyerlerinden pH'sı 7.2 olana ayrıca konsantrasyonu 50 µg/ml olan trimethoprim (SIGMA T 7883) solüsyonundan 0.5 ml ilave edildi.

Kas ve böbrek doku örneklerinin her birinden 6 adet, 8 mm çapında, 2 mm kalınlığında silindir şeklinde test örnekleri hazırlandı. Hazırlanan kas ve

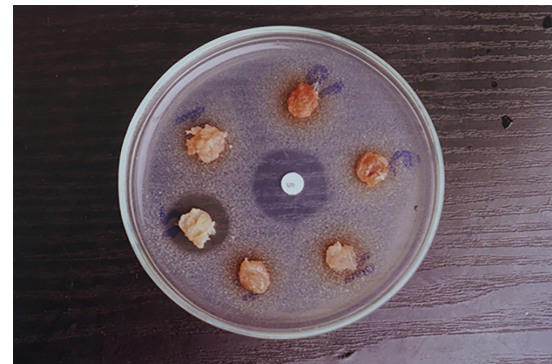
böbrek doku örnekleri her petriye altı adet olmak üzere, besiyerlerinin üzerine konuldu ve 30°C'de 18-24 saat inkube edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. Besiyerlerinin çalışmasını kontrol etmek için pH'sı 6.0 olan besi yerine 0.01 IU penisilin G, pH'sı 7.2 olan besiyerine 0.5 µg sulfadimidin ve pH'sı 8.0 olan besi yerine 0.5 µg streptomisin (Mast Diagnostica) içeren kontrol diskleri ve antibiyotik içermeyen doku örnekleri konuldu. Aynı gün kullanılmayan besiyerleri 4°C'de muhafaza edilerek 2 gün içerisinde kullanıldı. Kontrol disklerinin 30 °C'deki etüvde 18-24 saat sonunda 5-10 mm arasında zon vermesi ve bilinen negatif kontrollerin zon vermemesi besiyerlerinin çalıştığı şeklinde değerlendirildi. Örneklerden 2 mm'den geniş zon verenler pozitif, 1-2 mm arasında zon verenler ise şüpheli kabul edildi (Anonim, 1986).

## Bulgular

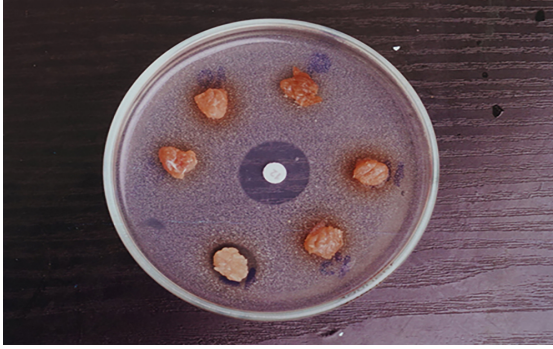
Bu çalışma kapsamında mezbahadan alınan örneklerde; aynı sığira ait 1 kas ve 1 böbrek dokusu örneğinin pH 7.2'de, 1 böbrek dokusu örneğinin pH 8.0'de antibiyotik varlığı yönünden pozitif; 3 böbrek dokusu örneğinin pH 6.0 ve 7.2'de, 1 böbrek dokusu örneğinin ise; sadece pH 6.0'da şüpheli sonuç verdiği tespit edildi (Tablo 1, 2).



**Şekil 1.** P4 numaralı kas dokusu örneğinin pH 6.0'daki görünümü.



**Şekil 2.** P4 nolu kas dokusu örneğinin pH 7.2'deki görünümü.



**Şekil 3.** P4 numaralı kas dokusu örneğinin pH 8.0'deki görünümü.

Parekende satış yerlerinden alınan kas örneklerinden; 3'ü pH 6.0 ve 7.2'de, 1'i ise pH 6.0, 7.2 ve 8.0'de pozitif sonuç verdi (Tablo 1, 2, Şekil 1, 2, 3).

İncelenen toplam 300 örneğin 5'i kas ve 2'si böbrek dokusu örneği olmak üzere 7 (%2.3)'sinde antibiyotik kalıntısı bulunduğu saptandı. Böbrek örneklerinden 4 (%1.3)'ü şüpheli olarak

değerlendirildiğinde, 289 (%96.3) örnekte antibiyotik varlığı tespit edilmedi. (Tablo 1). Kontrol diskleri 7-8 mm'lik inhibisyon zonu verirken negatif kontroller inhibisyon zonu göstermedi.

### Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda, kasaplık hayvan dokularında antibiyotik kalıntısı varlığının tespit edildiği bildirilmektedir (Aydemir ve ark., 2019; Bahmani ve ark., 2019; Gruber ve ark., 1988; Oruç ve ark., 2007; Sanz ve ark., 2015; Wahab ve ark., 2011; Yüksel, 2001; Zamora ve Yabut, 1989).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda; Yüksel (2001) tarafından; disk difüzyon ve farklı bakterilerin kullanıldığı üç plak yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, Ankara piyasasından temin edilen 50 adet sığır böbreğinin %14'ünde oksitetrasiklin kalıntılarının saptandığı, Oruç ve ark. (2007) tarafından ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada,

**Tablo 1.** İncelenen kas ve böbrek dokusu örneklerinde antibiyotik kalıntısı varlığı.

Örneklem Yeri	Örnek Tipi	Örnek Sayısı	Pozitif n (%)	Şüpheli n (%)	Negatif n (%)
Mezbaha	Böbrek	100	2 (2)	4 (4)	94 (94)
	Kas	100	1 (1)	-	99 (99)
Parekende Satış Yerleri	Kas	100	4 (4)	-	96 (96)
<b>Toplam</b>		<b>300</b>	<b>7 (2.3)</b>	<b>4</b>	<b>289 (96.3)</b>

**Tablo 2.** İncelenen örneklerde farklı pH değerlerinde alınan sonuçlar.

Örneklem Yeri	Örnek No	Örnek Tipi	Pozitif			Şüpheli		
			pH 6.0	7.2	8.0	pH 6.0	7.2	8.0
Mezbaha	P1*	Kas		x				
	P2*	Böbrek		x				
	P3	Böbrek						x
Parakende Satış Yeri	P4	Kas	x	x				x
	P5	Kas	x	x				
	P6	Kas	x	x				
	P7	Kas	x	x				
Mezbaha	Ş1	Böbrek						x
	Ş2	Böbrek						x
	Ş3	Böbrek						x
	Ş4	Böbrek						x

P: Pozitif bulunan örnekleri göstermektedir Ş: Şüpheli bulunan örnekleri göstermektedir. \*Aynı karkasa ait kas ve böbrek dokusudur.

Bursa ve civarından toplanan 63 sığır eti örneğinde streptomisin ve 60 sığır eti örneğinde sulfametazin kalıntılarının sırası ile %6 ve %1.5 oranında tespit edildiği, bununla birlikte tespit edilen kalıntı düzeylerinin, yasal olarak izin verilen maksimum

kalıntı limitlerinin altında bulunduğu bildirilmektedir. Aydemir ve ark. (2019) tarafından Şanlıurfa'da kasaplarda satışa sunulan 20 sığır ve 20 koyun olmak üzere toplam 40 kıyma örneğinde Premi®Test ile yapılan çalışmada, sığır kıyma

örneklerinde %50, koyun kıyma örneklerinde ise %60 pozitif sonuç tespit edildiği belirtilmektedir.

Bu araştırmada bulunan %2.3 oranındaki pozitif sonuç; hayvanlara çeşitli hastalıklar nedeniyle tedavi amaçlı antibiyotik uygulanmasını takiben antibiyotiğin yasal arınma süresinden önce hayvanların kesime sevk edilmesi, hayvanla ilgili tedavi kayıtlarının düzgün tutulmaması, kesim öncesi süreçte hayvan sahibinin değişmesi ve önerilen dozun üzerinde antibiyotik kullanımı kaynaklı olabilir. Bu araştırma ile ülkemizde yapılan diğer araştırma sonuçları arasındaki farklılık kullanılan örnek sayıları, metot farklılıkları ve örneklerin toplandığı alanlardaki yetiştirme pratiğinden kaynaklanabilir.

Ette antibiyotik kalıntılarının varlığını araştırmak için farklı ülkelerde yapılan çalışmaların sonuçları değişkenlik göstermektedir. Sanz ve ark. (2015) İspanya'da 1302 örneğin %7.1'inde, Wahab ve ark. (2011) Sudan'da 300 örneğin %17.3'ünde, Bahmani ve ark. (2019) İran'da 360 örneğin %21.3'ünde antibiyotik kalıntısı varlığının tespit edildiğini bildirmektedir. Bulunan sonuçlar sunulan çalışmadaki %2.3'lük pozitiflik oranından çok yüksektir.

Bu çalışmada aynı sığıra ait kas ve böbrek örneğinde %1, sadece böbrekte ise %0.5 oranında pozitif sonuç bulunmuştur. Üç Plak Testi kullanarak, Avusturya'da 9212 kas ve böbrek dokusu örneğinde yapılan bir çalışmada örneklerin %2.9'unun antibiyotik kalıntı varlığı yönünden pozitif bulunduğu, kas ve böbreğin her ikisinde birden %1.01, sadece böbrekte ise %1.9 oranında pozitif sonuç bulunduğu bildirilmektedir (Gruber ve ark., 1988). Bulunan sonuç bu çalışma sonuçları ile benzerdir.

Filipinler'de 50 adet domuz kası örneği ile Üç Plak Testi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada; %12 oranında pozitif, %8 oranında ise şüpheli sonuç tespit edildiği, pozitif bulunan 6 örneğin 5'inin pH 6.0 ve 7.2'de ve 1 tanesinin de her üç pH'da da pozitif reaksiyon verdiğini bildirilmektedir (Zamora ve Yabut, 1989). Araştırmacıların bulduğu sonuç ile benzer şekilde bu çalışmada parekende satış yerlerinden alınan kas örneklerinin 4'ü pozitif bulunmuş ve pozitif kas örneklerinden 3'ünün pH 6.0 ve 7.2'de 1 kas örneğinin ise pH 6.0, 7.2 ve 8.0'de pozitif olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2, Şekil 1, 2, 3). Üç Plak Testinde; tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, penisilin, basitrasin, nalididik asit, flavomisin, kloramfenikol vb. antibiyotiklerin pH 6.0'da, sulfonamidlerin trimetoprim ilave edilen pH 7.2'de aminoglikozid ve makrolidlerin ise pH'sı 8.0 olan besiyerinde optimum antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmektedir (Anonim, 1986). Bu çalışmada sadece pH 7.2'de pozitif sonuç veren aynı hayvana ait kas ve böbrek örneğinde sulfonamid

grubu, pH 8.0'de pozitif reaksiyon veren böbrek örneğinde ise aminoglikozid ve makrolid grubu bir antibiyotik kalıntısı bulunabilir. Birden fazla pH değerinde pozitif sonuç veren kas örneklerinde birden fazla antibiyotik kalıntısı bulunabileceği gibi, bir pH'da optimum aktivite gösterirken diğer pH'larda da aktivite gösterebilen bir antibiyotik kalıntısının da bulunabileceği düşünülmektedir.

Üç Plak Testinde aynı antibiyotik için farklı pH değerine sahip besiyerlerinde inhibisyon zonlarında 4-6 mm değişikliğinin olduğu bildirilmektedir (Schramm ve ark., 1994). Benzer şekilde bu çalışmada, her üç pH'da da pozitif reaksiyon veren kas örneğinin, pH 6.0, 7.2 ve 8.0'de sırası ile 6 mm, 5 mm ve 2 mm inhibisyon zonu verdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; antibiyotik kalıntıları insanlarda çeşitli toksik etkilere ve teknolojide üretim hatalarına, sıklıkla ve uygun olmayan şekilde antibiyotik kullanılması patojen bakterilerde antibiyotik direnci gelişmesine neden olabilmektedir. Tüm bunlar gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Bu nedenle gıda güvenliği yetkilileri ve sahada çalışan veteriner hekimler tarafından, antibiyotiklerin kullanım koşulları ile yanlış ve yasal olmayan kullanım kaynaklı tehlike ve riskler konusunda hayvan yetiştiricilerinin bilgilendirilmeleri önemli görülmektedir.

## Kaynaklar

- Acaröz U, Arslan Acaröz D, Gürler Z, 2016: Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi. *Kocatepe Vet J*, 9(2), 122-126.
- Anonim, 1986: Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleishhygienegesetz (VwVFIHG) VOM 11.Dezember 1986, (Banz. Nr.238a vom 23. Dezember 1986).
- Aydemir MA, Kılıç Altun S, Durmaz H, 2019: Detection of Antibiotic Drug Residues with Premi®Test in Sold Meats in Şanlıurfa Province. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 8 (2), 128-131.
- Aydın A, Yılmaz Aksu F, 2015: Gıdalarda Veteriner İlaç Kalıntıları. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 1(1), 1-9.
- Bahmani K, Shahbazi Y, Nikousefat Z, 2019: Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin. *Food Sci Biotechnol*, 26;29(3):441-448
- Bayou K, Haile N, 2017: Review on Antibiotic Residues in Food of Animal Origin: Economic and Public Health Impacts. *Appl J Hygiene*, 6(1), 01-08.
- Beyene T, 2016: Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *J Veterinar Sci Technol*, 7, 285.

- Chafer-Pericas C, Maquieira A, Puchades R, 2010: Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends Anal Chem*, 29(9), 1038-1049.
- Founou LL, Founou RC, Essack SY, 2016: Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Front Microbiol*, 7, 1881.
- Gruber VH, Hinterdorfer F, Jarc H, 1988: Erfahrungen mit der Verwendung einer B. licheniformis-Platte zum besseren Sulfonamid nachweis im biologischen Hemmstoff test. *Wien Tierarztl Mschr*, 76, 157-160.
- Gürbüz S, Keskin O, Gürbilek SE, Tel OY, Akin Yigin A, Demirci M, 2018: Presence of Staphylococcus aureus, staphylococcal enterotoxins and antimicrobial resistance in traditionally produced raw milk cheeses. *J Food Saf Food Qual*, 69, 171-176.
- Jabbar A, Ur-Rehman S, 2013: Microbiological Evaluation of Antibiotic Residues in Meat, Milk and Eggs. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 2(5), 2349-2354.
- Kantiani L, Marinella Farré M, Barceló D, Barceló D, 2009: Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends Anal Chem*, 28(6), 729-744.
- Oruç HH, Cengiz M, Bağdaş D, Uzunoğlu İ, 2007: Sığır Etlerinde Streptomisin ve Sulfametazin (Sulfadimidin) Kalıntıları. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 26(1-2), 17-20.
- Pikkemaat MG, 2009: Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal Bioanal Chem*, 395, 893-905.
- Prajwal S, Vasudevan VN, Sathu T, Irshad A, Nayankumar SR, Pame K, 2017: Antibiotic residues in food animals: Causes and health effects. *J Pharm Innov*, 6(12), 01-04.
- Sanz D, Razquin P, Condón S, Juan T, Herraiz B, Mata L, 2015: Incidence of Antimicrobial Residues in Meat Using a Broad Spectrum Screening Strategy. *Eur J Nutr Food Saf*, 5(3), 156-165.
- Schramm G, Ellerbroek L, Weise E, Reuter G, 1994: Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in fleisch 2 Experimenteller vergleich des Neuen Niederlandischen Nierentestsund der US-amerikanischen STOP-und Cast-Test mit dem Dreiplattentest. *Fleischw*, 74, 649-652.
- Singh S, Shukla S, Tandia N, Kumar N, Paliwal R, 2014: Antibiotic Residues: A Global Challenge. *Pharma Sci Monit*, 5(3), 184-197.
- Vishnuraj MR, Kandeepan G., Rao KH, Chand S, Kumbhar V, 2016: Occurrence, public health hazards and detection methods of antibiotic residues in foods of animal origin: A comprehensive review. *Cogent Food Agric*, 2, 1, 1235458.
- Wahab Alla MB, Mohamed TE, Abdelgadir AE, 2011: Detection of Antibiotics Residues in Beef in Ghnawa Slaughterhouse, Khartoum State, Sudan. *U of K. J. Vet. Med. & Anim. Prod*, 2 (1), 71-88.
- Yıbar A, Soyutemiz E, 2013: Antibiotics Use in Food-Producing Animals and Possible Residual Risk. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 8(1), 97-104.
- Yüksek N, 2001 Etlerde Antibiyotik Kalıntılarının Aranması Üzerinde Çalışmalar. *J Fac Vet Med*, 20, 85-90.
- Zamaro BM, Yabut JMP, 1989: Detection of antibacterial residues in pork using Hermsstoff test. *Phil J Vet Med*, 26, 3-6.

\*Bu makale "Sığır Etlerinde Antibakteriyel İnhibitör Maddelerin Aranması" başlıklı doktora tez çalışmasından türetilmiştir.

**\*\*Yazışma adresi:** Semra GÜRBÜZ

Mardin Artuklu Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Mardin, Türkiye.

**e-mail:** semragurbuz@gmail.com

## The Effect of Plantain Active Ingredient Aucubin on Isolated Rat Smooth Muscle Tissue and Primary Cell Lines

Emre ARSLANBAŞ<sup>1,a,\*</sup>, Haki KARA<sup>2,b</sup>, Nergiz Hacer TURGUT<sup>3,c</sup>, Hüseyin GÜNGÖR<sup>2,d</sup>, Halef Okan DOĞAN<sup>4,e</sup>, Mustafa Ozan ATASOY<sup>5,f</sup>, Alper Serhat KUMRU<sup>2,g</sup>

<sup>1</sup>Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology Department, Erzurum, Turkey

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology Department, Sivas, Turkey

<sup>3</sup>İzmir Kâtip Çelebi University, Faculty of Pharmacy, Pharmacology Department, İzmir, Turkey

<sup>4</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Medicinal Biochemistry Department, Sivas, Turkey

<sup>5</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Sivas, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-0030-7195, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-0295-0582, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-1700-2451, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-2506-3855, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0001-8738-0760, <sup>f</sup>ORCID: 0000-0003-0096-6297, <sup>g</sup>ORCID: 0000-0001-8462-4264

Tarihi: 15.05.2020

Kabul Tarihi: 18.06.2020

**Abstract:** This study aims to assess the pharmacodynamics of aucubin, the active ingredient in plantain (*Plantago*), *in vitro* rat bladder and trachea tissues, and explore its cell protective effects on primary lung and kidney cell lines. The study was carried out by repeated applications of acetylcholine, atropine, verapamil and oxybutynin, alongside Ca<sup>++</sup> in a calcium-free environment, on urinary bladder tissue, and repeated applications of acetylcholine, atropine, carbachol and mecamlamine on trachea tissue. At the same time, cell viability and catalase and superoxide dismutase activities was measured in primary cell lines. The results indicated that aucubin had a relaxant effect on urinary bladder and trachea tissues. It was conceived that aucubin acted as a cholinergic antagonist through different subreceptors (muscarinic-3 receptors). The results also indicated that aucubin caused a statistically insignificant increase in remaining at the level of the control group in cell viability in the primary lung and kidney cell lines at increasing concentrations (1-10 µM), while causing a significant reduce in cell viability at 20 and 50 µM concentrations in the same cell lines. In conclusion, it is suggested that plantain, which is used in folk medicine, and its active ingredient aucubin might have beneficial effects on bronchoconstriction and other respiratory conditions, as well as on pulmonary and renal diseases, urinary incontinence, etc.

**Keywords:** *Plantain, Aucubin, Urinary bladder, Trachea tissue, Smooth muscle, Primary cell line.*

### Sinir Otu Etkin Maddesi Aucubinin İzole Rat Düz Kasları ve Primer Hücre Hatları Üzerine Etkisi

**Özet:** Bu çalışmada, sinir otu (*Plantago*) etkin maddesi aucubinin *in vitro* rat idrar kesesi ve trakea dokusunda farmakodinamik ve primer akciğer ve böbrek hücre hatları üzerine hücre koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışma, idrar kesesi dokusuna tekrarlı olarak asetilkolin, atropin, verapamil ve oksibutin ile kalsiyumsuz ortamda Ca<sup>++</sup> verilerek, trakea dokusuna ise tekrarlı asetilkolin, atropin, karbakol ve mekamilamin uygulamalarıyla yapıldı. Aynı zamanda, primer hücre hatları üzerinde hücre canlılığı, katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin ölçümü gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, aucubinin idrar kesesi ve trakea dokusunda gevşetici etkisi belirlendi. Aucubinin kolinerjik antagonist olduğu, ancak bu etkisini farklı subreseptörler (muskarinik-3 reseptörler) üzerinden gösterdiği düşünüldü. Ayrıca, artan konsantrasyonlarda (1-10 µM) primer akciğer ve böbrek hücre hatlarında hücre canlılığında kontrol grubu seviyesinde kalan istatistiksel olarak önemsiz bir artışa neden olurken, aynı hücre hatlarında 20 ve 50 µM konsantrasyonlarda hücre canlılığında önemli bir düşüşe neden olduğu belirlendi. Sonuç olarak, halk arasında tedavi amacıyla kullanılan sinir otunun ve etkin maddesi aucubinin solunum yolları daralması ve hastalıkları, akciğer ve böbrek hastalıkları, üriner inkontinans vb. durumlarda yararlı olabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Sinir otu, Aucubin, İdrar kesesi, Trakea dokusu, Düz kas, Primer hücre hattı*

### Introduction

Plantain is a group of plants in the *Plantago* genus of the *Plantaginaceae* family, known with the names of fleaworth, ribleaf, ribworth, white man's foot, narrowleaf or broadleaf plantain (Yıldırım and Ekim, 2003; Deniz et al., 2010). Leaves, seeds, infusion and paste of plantain are used for medicinal purposes (Ezer and Avci, 2004; Deniz et al., 2010; Akan and Bakır Sade, 2015).

Plantain is reported to have a beneficial effect on wound healing, digestive and circulatory system

organs and skin conditions alongside its various other anti-inflammatory, antibacterial, anti-cancer and immunomodulator effects. The plant contains several active ingredients, primarily iridoid glycosides (aucubin, aucubigenin, catalpol, melittoside) as well as caffeic acid derivatives (plantamajoside and acteoside), alkaloids and flavonoids (Rønsted et al., 2000; Samuelsen, 2000). An important iridoid glycoside, aucubin is noted for its antimicrobial, hepatoprotective,



neuroprotective, anti-inflammatory and antitumoral effects (Rakotondramasy et al., 2010; Xu et al., 2012; Xue et al., 2012; Kim et al., 2014).

There are a limited number of studies that explore the pharmacodynamics of aucubin (Atta and Mouneir, 2005; Fleer and Verspohl, 2007). At the same time, cell culture studies are mainly focused on the anticancer effects of aucubin (Hung et al., 2008; Rakotondramasy et al., 2010; Xu et al., 2012; Xue et al., 2012; Kim et al., 2015). This study aims to assess the pharmacodynamics of aucubin, the active ingredient in plantain, on *in vitro* rat bladder and trachea tissues, and explore its cell protective effects on primary lung and kidney cell lines.

### Materials and Methods

**Chemicals:**The active ingredient used in the study, aucubin (55561) was obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, US) and used to prepare a 1 mg/ml stock solution in ultrapure water. The remainder of the agents, namely acetylcholine (A6625), verapamil (V4629), oxybutynin (O2881), carbachol (C4382), PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D5652), RPMI-1640 Medium (R8758) and thiazolyl blue tetrazolium bromide (M5655) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, US); calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>, 328757) from Carlo Erba Reagents S.A.S. (Italy); penicillin/streptomycin/amphotericin B (450-115 EL) from Wisent Inc. (Canada); atropine (226680100) from Acros Organics (Belgium); mecamlamine (M202600) from Toronto Research Chemicals Inc. (Ontario, Canada); trypsin (25200056) Gibco, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, US); and FBS (Fetal Bovine Serum, S181G) Biowest (Nuaille, France). All agents used in the study were analytical grade.

**Animals:** In this study, 36 adult Wistar Albino male rats of 6 to 9 months of age, each weighing 250±20 g, were used and the animals were raised in Laboratory Animals Department of Sivas Cumhuriyet University. The study was conducted by the approval of Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Board (65202830-050.04.04-49 dated April 6, 2016).

**Pharmacodynamics Studies:**The tissues used in the study were extracted and hanged in the isolated organ bath in line with the methods specified by Çelebi and Doğan (2000) and Baydan et al. (2014) for urinary bladder, and by Estrade-Soto et al. (2012) for trachea tissue. Each isolated urinary bladder was placed in Krebs solution (in mM: NaCl 118; KCl 4.6; NaHCO<sub>3</sub> 25; MgSO<sub>4</sub> 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; glucose 10; EDTA 0.025; pH 7.4). Then, tissue samples were prepared in strip form and

placed in an isolated organ bath containing 5 ml Krebs solution at 37°C temperature and this mixture was constantly ventilated with a 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> gas mixture (Çelebi and Doğan, 2000; Baydan et al., 2014). Each isolated trachea tissue was placed in Krebs solution (in mM: NaCl 118; KCl 4.6; NaHCO<sub>3</sub> 25; MgSO<sub>4</sub> 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; glucose 10; pH 7.4). The trachea rings were then hung in the isolated organ bath at 37°C with the help of stainless steel rings and in a continuously ventilated 5 ml krebs solution with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> gas mixture (Estrade-Soto et al., 2012). Isometric smooth muscle movements of the tissues were monitored and recorded using a "force transducer" (Force Displacement Transducer-FDT 05, Commat İletişim Ltd., Turkey) and an "acquisition system" (MP150 Biopac System, Commat İletişim Ltd., Turkey). The tissue samples were initially applied with a tension of 1,000 mg, and they were allowed to get used to the environment provided that they change the solution of krebs every 15 minutes for at least 1 hour. Once they reached equilibrium, the bladder and trachea tissues were stimulated using acetylcholine at EC<sub>50</sub> values (10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, respectively). After the contraction response, krebs solution in the baths was replaced and the protocols stated below were followed (Yıldırım, 2005; Estrada-Soto et al., 2012; Baydan et al., 2014; Vasconcelos et al., 2016).

1. Single and cumulative concentration of aucubin applications to urinary bladder and trachea tissues

2. Acetylcholine application to urinary bladder and trachea tissues after incubation in aucubin

3. Aucubin application to urinary bladder after incubation in atropine, verapamil and oxybutynin

4. Aucubin application to trachea tissue after incubation in atropine, carbachol and mecamlamine

5. 1mM CaCl<sub>2</sub> application to urinary bladder smooth muscle in non-calcium Krebs solution after incubation in aucubin and verapamil

**Cell Culture Study:**The study was carried out on primary cell lines, which were obtained from the lung and kidney tissues taken from the rats used in the study in accordance with the method reported by Freshney (2010). Using the stock solution, five different concentrations of aucubin were prepared (1, 5, 10, 20 and 50 µM) and applied to the cell lines (Hung et al., 2008). The aucubin-applied cells were left to be incubated for 24 hours. After incubation, cell viability and antioxidant enzyme activities were measured. Cell viability was established using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cytotoxicity analysis

(Noureini and Esmaili, 2014). The test kit for the measurement of antioxidant, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities was used in line with the protocol recommended by the kit's producer (Cayman Chemical Company, US).

## Statistical Analyses

The results of the study are presented as mean and standard error of the mean (SEM). Contraction responses are expressed as affinity ( $pD_2$ ), with the  $pD_2$  value given as the negative logarithm of the molar agonist concentration that produces half of the maximum acetylcholine response ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ). The maximum response to the active ingredient was calculated as the percentage of the maximum response produced by the acetylcholine ( $E_{max}$ ). Mann-Whitney U test was utilized to assess the difference between the tissue samples. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .  $pD_2$ ,  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  and  $IC_{50}$  values were calculated using GraphPad Prism (Version 8.2.0), while CAT and SOD results analyses and other statistical analyses were made using SPSS (Version 23).

## Results

### Pharmacodynamics Results

**Single and cumulative concentration aucubin applications to urinary bladder and trachea tissues:** Aucubin was observed to have under the baseline a relaxant effect on urinary bladder and trachea tissues in single and cumulative concentrations. In cumulative concentration applications to urinary bladder and trachea tissues,  $pD_2$  and  $E_{max}$  values were  $4.634 \pm 0.03$  and  $102.8 \pm 0.36$ ;  $5.118 \pm 0.10$  and  $102.2 \pm 2.33$ , respectively. Based on the  $EC_{50}$  values obtained from single and cumulative concentration applications to the urinary bladder, the aucubin concentration  $5 \times 10^{-5}$  M was selected as the study concentration for the subsequent protocols as it produced a better response (Figure 1A). For trachea tissues, the study focused on cumulative concentration applications as these were revealed to produce a more pronounced results than those of single concentration.

**Acetylcholine application to urinary bladder and trachea tissues after incubation in aucubin:** The response produced by the aucubin concentration of  $5 \times 10^{-5}$  M (36.35%) was observed to increase (87.18%) with the application of acetylcholine ( $P < 0.01$ ) (Figure 1B). Application of cumulative concentration ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M) of aucubin to trachea tissues followed by acetylcholine ( $10^{-5}$  M) resulted in an increase in contraction response;

however, no correlation was observed between the concentration and response.

### Aucubin application to urinary bladder after incubation in atropine, verapamil and oxybutynin:

The contraction created by aucubin (29.17%) on bladder showed a reduction in the presence of atropine ( $10^{-6}$  M) (17.88%), verapamil ( $10^{-7}$  M) (13.18%) and oxybutynin ( $10^{-8}$  M) (19.06%) ( $P < 0.05$ ). Responses to acetylcholine ( $10^{-6}$  M) in the presence of the same antagonists showed a decline ( $P < 0.01$ ) (Figure 1C).

### Aucubin application to trachea tissue after incubation in atropine, carbachol and mecamlamine:

The contraction created on tracheal tissue (28.41%) by cumulative concentrations of aucubin ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M) changed in the presence of atropine ( $10^{-6}$  M), carbachol ( $10^{-6}$  M) and mecamlamine ( $10^{-5}$  M) (responses: 27.36%, 31.16% and 27.65%, respectively) ( $P > 0.05$ ). A statistically significant difference was observed between the responses to acetylcholine ( $10^{-5}$  M) in the presence of the same agents and aucubin responses ( $P < 0.01$ ) (Figure 1D).

### 1mM CaCl<sub>2</sub> application to urinary bladder smooth muscle in non-calcium Krebs solution after incubation in aucubin and verapamil:

Aucubin response (tension difference: 36.5) was observed to increase (tension difference: 97.66) upon application of 1mM CaCl<sub>2</sub> following aucubin ( $5 \times 10^{-5}$  M) and verapamil ( $10^{-7}$  M) incubation in non-calcium Krebs solution, with the increase taking the form of a stronger response ( $P < 0.01$ ) (Figure 1E).

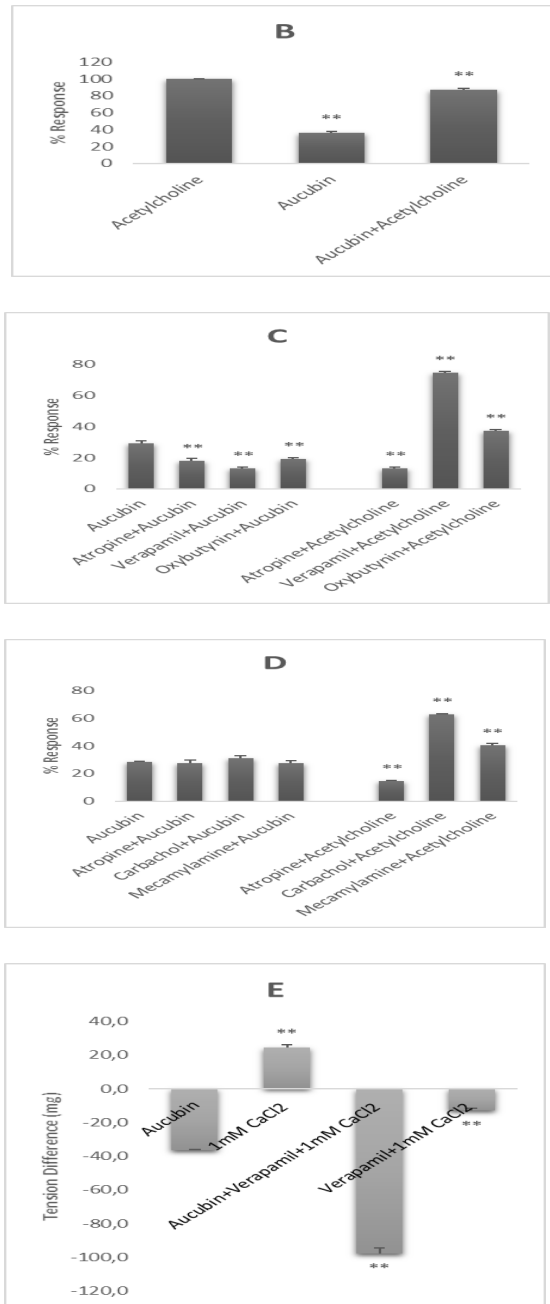
### Cell Culture Results

**MTT Results:** Cell viability was shown to be at a maximum in cells treated with 10  $\mu$ M of aucubin, with further increases in concentration reducing cell viability (Figure 2A). Aucubin application revealed an  $IC_{50}$  value of 18.80  $\mu$ M in primary lung cells, and 17.63  $\mu$ M in primary kidney cells.

**CAT and SOD Results:** CAT levels showed a statistically significant increase as a result of application of aucubin in concentrations of 5, 10  $\mu$ M to primary lung cells ( $P < 0.05$ ) and in concentrations of 1, 5, 10  $\mu$ M to primary kidney cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 2B); likewise, concentrations of 10  $\mu$ M in primary lung and kidney cells ( $P < 0.05$ ) increased SOD levels significantly compared to control (Figure 2C).

## Discussion and Conclusions

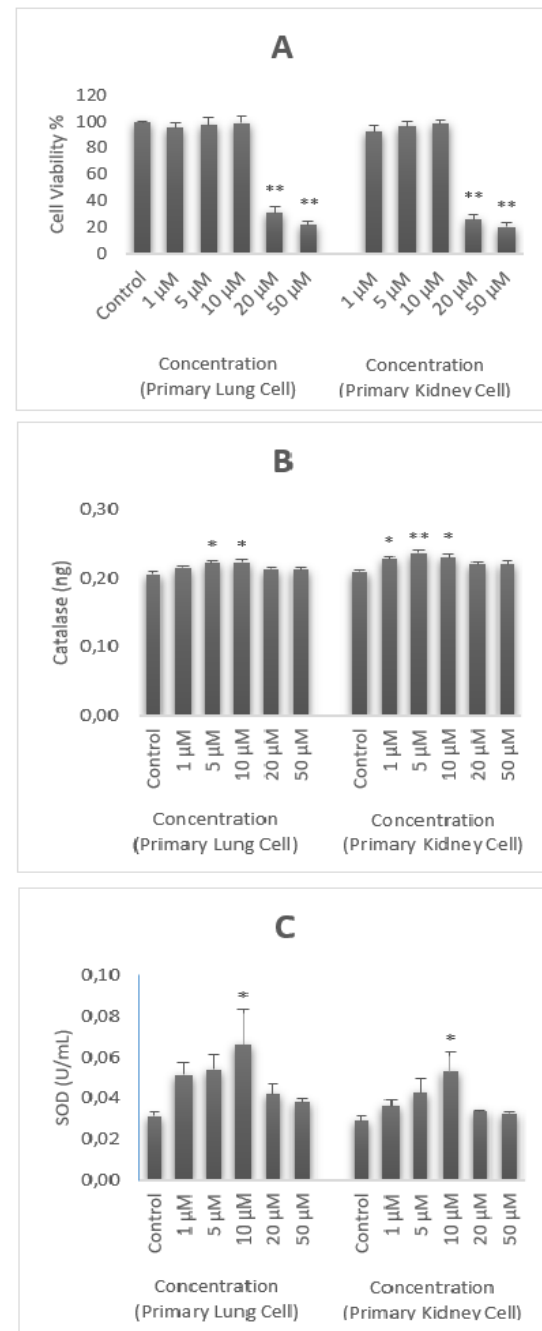
Since the earliest times, humans have been using plants as food as well as medicine for a variety of diseases and conditions. It is necessary to identify the local names, active ingredients, action mechanisms and usage indications of the plants and



**Figure 1.** Single concentration relaxing responses to aucubin in bladder (A), acetylcholine ( $10^{-6}$ ) relaxing response on single-concentration application of aucubin to bladder (B), agonist/antagonist aucubin, agonist/antagonist acetylcholine relaxing responses in bladder (C) and in trachea tissue (D), 1 mM  $CaCl_2$  relaxing responses in bladder after aucubin and verapamil ( $10^{-7}$  M) incubation in non-calcium krebs solution (E) (\*\*  $P < 0.01$ ).

herbs used in traditional medicine to ensure their proper, efficient and sufficient use (Akan and Bakir Sade, 2015).

This study aims to explore the pharmacodynamics of aucubin, the active ingredient in plantain, an herb used in folk medicine, on *in vitro* rat bladder and trachea tissues as well as its cell protective effects on primary lung



**Figure 2.** Cell viability % values of primary lung and kidney cells treated with aucubin (A), catalase (B) and SOD values of primary lung and kidney cells treated with aucubin (C) (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ).

and kidney cell lines. The results of this study showed that aucubin had a relaxant effect on urinary bladder and trachea tissues (Figure 1A). In a study, Fler and Verspohl (2007) assayed the antispasmodic effects of *P. lanceolata* L. and certain compounds isolated from its extract (aucubin, luteolin, acteoside) on guinea pig ileum and trachea tissues. According to their results, the extract reduces tracheal contractions induced by barium

ions and has an antispasmodic effect on ileum contractions induced by agonists such as acetylcholine, histamine, potassium and barium ions, with aucubin suppressing the acetylcholine-induced impulse. This study revealed that aucubin produces a lower response than acetylcholine. But, after aucubin treatment, percentage of response (%) increased with the application of acetylcholine (Figure 1B). These results were consistent with previous studies. Plantain's antispasmodic effects have been reported in other studies, with recent ones also documenting a bronchiolytic activity (Fleer and Versphol, 2007). Studies associated these effects with the tannins, flavonoids, unsaturated sterols/triterpenes, carbohydrates, lactones and proteins/aminoacids contained plantain (Atta and Mouneir, 2005). This study has revealed that atropine, verapamil and oxybutynin increased the relaxant effect of aucubin on urinary bladder ( $P<0.05$ ) (Figure 1C). On the other hand, it was shown that the relaxant effect produced on trachea tissue by cumulative concentrations of aucubin ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M) increased slightly in the presence of atropine and mecamlamine, but decreased in the presence of carbachol (Figure 1D). Aucubin response was observed to increase upon application of 1mM  $CaCl_2$  following verapamil incubation in non-calcium krebs solution, with the increase taking the form of a stronger response (Figure 1E). In a study by Atta and Mouneir (2005) who explored the effect of extracts of *P. major* L. and seven other herbs on isolated rabbit duodenum tissue, it was reported that *P. major* L. extract inhibited duodenum movement after a brief impulse, and that it had a partial anti-diarrheal impact.

There are several studies that evaluate the effect of aucubin on various cancer cell lines, compared to a relatively limited number of studies that assess its effect of primary cell lines. Aucubin is reported to contribute to antiproliferative activity, alter antioxidative capacity and have a beneficial effect on pathological changes brought about by reactive oxygen species (Hung et al., 2008; Xue et al., 2011; Xue et al., 2012). In a study assessed the effects of aucubin on apoptosis induced by  $H_2O_2$  on rat pheochromocytoma (PC12) cell lines by regulating endogenous oxidant-antioxidant balance, results indicated aucubin's potential use as a protective agent in the treatment of oxidative stress-caused neurodegenerative diseases (Xue et al., 2012). This study revealed that aucubin application in different concentrations to primary lung and kidney cells produced a concentration-based change in CAT and SOD levels in comparison to the control group (Figure 2B, 2C).

Kim et al. (2014) reported that aucubin facilitated neural differentiation and neurite growth in neural stem cell culture obtained from rat primary embryonic hippocampus, as well as axonal outgrowth in peripheral nervous system injuries. As a result, the study noted aucubin's potential therapeutic use for neural regeneration in the treatment of various neural injuries. In this study, cell viability was at its maximum in primary lung and kidney cells treated with 10  $\mu$ M of aucubin (99.09% and 98.38%, respectively) (Figure 2A). However, further increases in concentration are reported to reduce cell viability and increase cytotoxic effect.

The results of this study revealed that aucubin, an active ingredient in plantain, had a relaxant effect on urinary bladder and trachea tissues among others. Aucubin was also shown to reduce the effect of acetylcholine, and to be affected in varying degrees by all antagonists. This study also conceives that aucubin acts as a cholinergic antagonist through different subreceptors (muscarinic-3 receptors) due to its interaction with oxybutynin. In addition, the study also revealed that aucubin caused a statistically insignificant increase in remaining at the level of the control group in cell viability in the primary lung and kidney cell lines at increasing concentrations (1-10  $\mu$ M) ( $P>0.05$ ), while causing a significant decrease in cell viability at 20 and 50  $\mu$ M concentrations in the same cell lines ( $P<0.01$ ) (Figure 2A). In conclusion, it is suggested that plantain, an herb used in folk medicine, and its active ingredient aucubin might have beneficial effects on bronchoconstriction and other respiratory conditions as well as pulmonary and renal diseases, urinary incontinence, etc.

## Acknowledgements

This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University under the project number V-055 (CÜBAP, Sivas, Turkey).

## References

- Akan H, Bakır Sade Y, 2015: Kâhta (Adıyaman) Merkezi ve Narince Köyü'nün etnobotanik açıdan araştırılması. *BEÜ Fen Bilim Derg*, 4, 219-248.
- Atta AH, Mouneir SM, 2005: Evaluation of some medicinal plant extracts for anti-diarrhoeal activity. *Phytother Res*, 19, 481-485.
- Baydan E, Kartal M, Yurdakök B, Erdem SA, İnce S, Ekici H, Alp H, 2014: Contractile effects of *Eryngium kotschy* Boiss. on rat isolated ileum and detrusor muscle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20, 779-785.
- Çelebi F, Doğan A, 2000: Bazı yerel anestezi ilaçlarının (lidokain, bupivakain, prilokain) ratlarda mesane

- kasları üzerine in vitro etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 6, 47-53.
- Deniz L, Serteser A, Kargıoğlu M, 2010: Uşak Üniversitesi ve yakın çevresindeki bazı bitkilerin mahalli adları ve etnobotanik özellikleri. *AKÜ Fen Bilim Derg*, 01, 57-72.
- Estrada-Soto S, Sánchez-Recillas A, Navarrete-Vázquez G, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, 2012: Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *J Ethnopharmacol*, 139, 513-518.
- Ezer N, Avcı K, 2004: Çerkeş (Çankırı) yöresinde kullanılan halk ilaçları. *Hacettepe Üniv Eczacı Fakültesi Derg*, 24, 67-80.
- Fleer H, Verspohl EJ, 2007: Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14, 409-415.
- Freshney RI, 2010: Primary Culture. In "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications", Ed; Freshney RI, John Wiley&Sons, Inc., New Jersey, USA.
- Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, Huang HW, Huang MS, 2008: Antiproliferative activity of aucubin is through cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35, 995-1001.
- Kim YM, Sim UC, Shin Y, Kwon YK, 2014: Aucubin promotes neurite outgrowth in neural stem cells and axonal regeneration in sciatic nerves. *Exp Neurol*, 23, 238-245.
- Kim MB, Kim C, Chung WS, Cho JH, Nam D, Kim SH, Ahn KS, 2015: The hydrolysed products of iridoid glycosides can enhance imatinib mesylate-induced apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytother Res*, 29, 434-443.
- Noureini SK, Esmaili H, 2014: Multiple mechanisms of cell death induced by chelidonine in MCF-7 breast cancer cell line. *Chem Biol Interact*, 223, 141-149.
- Rakotondramasy VC, Mouriès C, Cachet X, Neghra A, Mourabet ME, Tillequin F, Koch M, Deguin B, 2010: A novel series of cytotoxic iridoid glucosides derived from aucubin: Design, synthesis and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem*, 45, 2314-2320.
- Rønsted N, Göbel E, Franzyk H, Jensen SR, Olsen CE, 2000: Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*, 55, 337-348.
- Samuelsen AB, 2000: The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol*, 71, 1-21.
- Vasconcelos TB, Ribeiro-Filho HV, Lucetti LT, Magalhães PJC, 2016:  $\beta$ -citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. *Braz J Med Biol Res*, 49, 1-9.
- Xu W, Deng Z, Guo H, Ling P, 2012: A rapid and sensitive determination of aucubin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic application. *Biomed Chromatogr*, 26, 1066-1070.
- Xue HY, Niu DY, Gao GZ, Lin QY, Jin LJ, Xu YP, 2011: Aucubin modulates Bcl-2 family proteins expression and inhibits caspases cascade in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cells. *Mol Biol Rep*, 38, 3561-3567.
- Xue HY, Gao GZ, Lin QY, Jin LJ, Xu YP, 2012: Protective effects of aucubin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother Res*, 26, 369-374.
- Yıldırım E, 2005: Tavşan trakeası üzerine levamisolun etkisinin tek başına ve triklorfonla birlikte araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 23-28.
- Yıldırım A, Ekim T, 2003: Orta Anadolu Bölgesi yabancı ot florası. *Bitki Koruma Bül*, 43, 1-98.

\*Corresponding author: Emre Arslanbaş

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology Department, Erzurum/Turkey.

e-mail: emre.arslanbas@atauni.edu.tr

## Floresans Işımaya Bağlı Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Belirlenmesi

Erman Oryaşın<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID ID: 0000-0003-1242-7434

Geliş Tarihi: 24.05.2020

Kabul Tarihi: 08.06.2020

**Özet:** Disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemini kullanan otomatik sistemler son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez parçaları olmuşlardır. Ancak, *in vitro* ölçüm yapan bu sistemler bakterilerin doğal ortamında değil laboratuvar koşullarındaki hassasiyetlerini ölçmektedirler. Bu çalışmanın amacı antibiyotiklerin etkisinin floresans absorbansın ölçüm yöntemiyle belirlenmesini sağlayacak yöntem geliştirmektir. Bu çalışmada içlerinde floresan ışımaya yapan protein içeren bakteriler oluşturmak amacıyla rekombinant plazmidler hazırlanmıştır. Floresans kaynağı olarak yeşil floresans protein (GFP) pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidleri içeren bakterilerde konvansiyonel minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ölçümü yapılmıştır. Böylece besi yerindeki canlı hücrelerin yaydığı ışığın ölçülmesi esasına dayanarak alternatif bir MİK ölçüm yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Her bir antibiyotik grubu için pUC18-*gfp* ve pAT392-*gfp* plazmidlerini içeren ve içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi kullanılmıştır. *gfp* genini içermeyen bakteriler florometrik ölçüm yapabilen cihazda 24 saatlik ölçüm boyunca ışımaya vermeyen grafikleri doğrusal bir ivmeyle izlenmiştir. Ancak sadece canlı hücrelerde ışımaya yapabilecek olan pUC18-*gfp* ve pAT392-*gfp* plazmidini içeren bakteriler antibiyotiğin hiç uygulanmadığı kontrol grubuna göre oldukça yüksek pik yaptıkları gözlenmiştir. İnhibe edici dozlarda grafik doğrusal bir yapı kazanmıştır. Işımanın alındığı konsantrasyonda en az 10 ışık birimi azalmanın okunduğu yere denk gelen antibiyotik dilüsyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Konvansiyonel MİK değerleri ile florometrik MİK değerleri karşılaştırılmış en çok 2 dilüsyon fark saptanmıştır. Işımanın ölçülmesiyle MİK düzeyinin belirlenebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir. Geliştirilmeye çalışılan bu yöntem antibiyotiklerin bakterisidal/bakteriostatik etkilerinin saptanmasında, antibiyotiklerin biyofilm içindeki bakterilere etkilerinin gözlenmesinde kullanım potansiyeli vardır. Ayrıca yeni antibiyotik geliştirmede kullanılabilecek basit, ucuz ve kolay bir yöntem adayı olarak denenecek moleküllerin daha hızlı ve etkin şekilde değerlendirilmesini sağlayabilme potansiyeli vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Floresans protein, MİK, Antibiyotik direnci, Klonlama.

### Determination of Minimal Inhibition Concentration (MIC) by Fluorometry-based Method

**Abstract:** Automatic systems using the disc diffusion method and microdilution method have become indispensable parts of microbiology laboratories in recent years. However, these systems measure the sensitivity of bacteria in laboratory conditions, not in their natural environment. This study aims to develop a method that will determine the effect of antibiotics using the fluorescence absorbance measurement method. In this study, recombinant plasmids were prepared to create bacteria containing fluorescent protein in them. The fluorescence source was cloned into the green fluorescence protein (GFP) plasmids pUC18 and pAT392. Conventional minimal inhibition concentration (MIC) measurement was performed on bacteria containing recombinant plasmids obtained. Thus, an alternative MIC measurement method was developed based on measuring the light emitted by living cells in the medium. *E. coli* DH10B bacteria with and without pUC18-*gfp* and pAT392-*gfp* plasmids were used for each antibiotic group. Bacteria that do not contain the *gfp* gene were monitored with a linear acceleration in the device capable of fluorimetric measurement that did not emit radiation during the 24-hour measurement. However, bacteria containing pUC18-*gfp* and pAT392-*gfp* plasmids, which can only radiate in living cells, have been observed to have a very high peak compared to the control group in which the antibiotic was not applied at all. The graphic gained a linear structure at inhibitory doses. The antibiotic dilution corresponding to where the at least 10 light units decrease in the concentration at which the irradiation was taken was accepted as the MIC value. Conventional MIC values were compared with fluorimetric MIC values and a maximum of 2 dilution differences were found. It has been shown in this study that the level of MIC can be determined by measuring the radiation. This method, which is tried to be developed, has the potential to be used in determining the bactericidal/bacteriostatic effects of antibiotics and in monitoring the effects of antibiotics on bacteria in the biofilm. It also has the potential to enable faster and more efficient evaluation of the molecules to be tried as a simple, inexpensive, and easy method candidate that can be used in developing new antibiotics.

**Keywords:** Fluorescence protein, MIC, Antibiotic resistance, Cloning.

### Giriş

Yeşil Floresan Protein (GFP) ilk olarak 1960'lı yıllarda *Aequorea victoria* olarak tanımlanmış

denizanasından elde edilmiş ve floresans protein olarak adlandırılmasıyla üzerinde çalışılmaya

başlanmıştır (Shimomura ve ark., 1962). *A. victoria*'nın GFP proteini doğal floresandır yani dışardan herhangi bir substrat ya da kofaktöre gereksinim olmadan floresans ışımaya yapabilmektedir (Collins ve ark., 1998). GFP proteinini kodlayan *gfp* geninin marker bir gen olarak kullanılmaya başlanması model organizma olan *Escherichia coli*'ye 1994 yılında ilk kez klonlanması ile başlamıştır (Chalfie ve ark., 1994). Bu tarihten sonra *gfp* geni çeşitli organizmalarda (bakteri, maya, sinek, çeşitli memeliler...vb.) raportör gen olarak kullanılmaya başlamış ve günümüze kadar tüm dünyada bitki, hayvan ve mikrobiyolojik araştırma laboratuvarlarında çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. 2008 yılında Nobel Komitesi tarafından "GFP geliştirilmesi ve keşfi için" GFP bilim dünyası tarafından tamamen tanınır olmuştur (Anonim, 2020). GFP yirmi birinci yüzyılın moleküler mikroskobu olarak nitelendirilmektedir. Çünkü GFP ile, bir proteinin ne zaman üretildiğini ve nerede üretildiğini izleme ve görme imkânı doğmaktadır. GFP proteini, 238 aminoasit molekülünden meydana gelmektedir. GFP genellikle toksik etkisi az olan bir proteindir ve farklı organizmalarda fizyolojilerini etkilemeden yüksek düzeyde ifade olabilmektedir (Chalfie ve ark., 1994). GFP'nin en yaygın kullanımı, GFP ile birlikte füzyon olan ekspresyon olmuş proteinlerin lokasyon, hareket ve kimyasal reaksiyonlarını da kapsayan bir izlemeye olanak sağlamasıdır. Hücrelerin farklı bölümlerindeki GFP füzyon proteinlerinin lokalizasyonları örneğin hücre döngüsü süresince veya logaritmik artış süresindeki durumları geniş ölçüde çalışılmaktadır (Elf ve ark., 2007). Hücreler içindeki kinetik fenomen çalışmalarını detaylandırmak için diğer bir pencere, GFP floresan temelinde tek molekül mikroskopisi ve tek hücre olarak tedarik edilmesidir (Xie ve ark., 2008). Daha çok organizmalardaki hücre canlılığını göstermek için, herhangi bir maddenin istenilen bölgeye veya hücreye ulaşip ulaşmadığının tespiti için kullanılmaktadır. Mikrobiyolojinin temel görevlerinden birisi doğrudan veya dolaylı olarak mikroorganizmaların varlığını göstermek ve ayırıcı tanılarını yapmaktır. Sağlık alanındaki diğer bir çalışma alanı ise tedaviye yön verebilmek amacıyla mikroorganizmaların antibiyotiklere olan hassasiyetlerini belirlemektir.

Çalışmamızda floresans ışık yayan sistem içeren bakteri oluşturmak amacıyla iki farklı rekombinant plazmid hazırlanmış ve bunların aktarıldığı bakterilerdeki farklı antibiyotiklerin etkisiyle ışımaya miktarında oluşan değişim ile minimal inhibe edici konsantrasyon (MİK) belirlenmesi ve konvansiyonel yöntem ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Bakteri izolatları, plazmidler ve üreme koşulları:** Bu çalışmada, bakteri içerisinde GFP içeren rekombinant plazmid hazırlanmıştır. GFP proteinini kodlayan genin çoğaltılıp klonlanması için DNA materyali Dr. Leclercq tarafından laboratuvarımıza (REF-M1) gönderilmiştir (Clarebout ve Leclercq, 2002). Bakteriyel suşlar, 37 °C'de Tryptik Soy Broth (TSB) ve/veya Tryptik Soy Agar (TSA) besiyerlerinde büyütülmüştür. Plazmidlerin saflaştırılmasında plazmid miniprep kiti (Thermo) üretici talimatlarında belirtildiği protokole göre kullanılmıştır. Transformasyon için alıcı suş olarak *E. coli* DH10B kullanılmıştır. pUC18 ve mekik (shuttle) vektör pAT392, klonlama vektörleri olarak kullanılmıştır.

***gfp* geninin pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanması ve plazmid konstrüksiyonu:** *gfp* genini çoğaltmak ve doğru yönde klonlayabilmek için Gen Bankasında M62653 erişim numaralı sekans üzerinden KpnI ve BamHI restriksiyon kesim yerleri eklenerek primer dizayn edildi. Dizayn edilen GFP **KpnI**-Forward:5'-AAGGTACCAGATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3' ile GFP **BamHI**-Reverse:5'-TTGGATCCTTTATTGTATAGTTCATCCAT-3' primer çifti kullanılarak PCR yoluyla çoğaltıldı. pUC18 plazmid ve çoğaltılmış olan *gfp* geni KpnI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Amplikonların restriksiyonu için, 10 µl *gfp* amplikonu, 2 µl 10X buffer ve 1 µl KpnI, 1 µl BamHI enzimi ve 6 µl steril su kullanılmıştır. pUC18 plazmid de aynı koşullarda kesilmiş ve bu iki restriksiyon ürünü fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiştir. Presipitasyondan sonra ligasyon reaksiyonu amacıyla, kesilmiş pUC18 plazmid ve *gfp* genini içeren pellet 17 µl distile suda resüspanse edilmiş ve 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) eklenerek 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. pUC18::*gfp* ligandı *E. coli* DH10B suşuna transforme edilmiştir ve final konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranoz (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-D-galaktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerinde seçilmiştir. Elde edilen rekombinant kolonilerin floresansı UV ışığı altında transillüminatör cihazı kullanarak kontrol edilerek, yeşil floresans ışımaya yapan kolonilerden, *gfp* genine spesifik primerlerle PCR yoluyla çoğaltılmıştır (Salih ve ark., 2020). Sekans analizi ile doğrulanmasının ardından pUC18-*gfp* olarak isimlendirilmiştir. pAT392 plazmidine aktarmak için yine aynı primer çifti kullanılmış ve seçici besiyeri kısmına kadar aynı protokoller uygulanmıştır. pAT392 plazmid üzerinde var olan *aac(6)-aph(2)* geni nedeniyle 20 µg/ml gentamisin antibiyotigi içeren TSA agar seçici besiyerinde



seçilmiştir. Transilluminatör cihazında UV ışığı altında yeşil ışımaya yapan kolonilerden alınarak PCR yoluyla genin varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca elde edilen ampikon sekansa gönderilerek *gfp* geninin varlığı konfirme edilerek pAT392-*gfp* olarak isimlendirilmiştir.

**MİK ölçümü:** *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için kloramfenikol ve gentamisin ile, ve *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* rekombinant bakterisi için ise kloramfenikol ve ampicilin antibiyotikleri kullanılarak CLSI rehberi sıvı mikrodilüsyon method ile duyarlılıkları belirlenmiştir (CLSI Rehberi, 2014). MİK ölçümü için antibiotik konsantrasyonları 0.06 µg/ml - 128 µg/ml aralığında kullanılmıştır. Herhangi bir antimikrobiyal ajanın ve bakterinin eklenmediği Mueller Hinton broth kontaminasyon varlığı testi için negatif kontrol olarak, sadece bakteri süspansiyonunun eklendiği herhangi antimikrobiyal ajanın eklenmediği besiyeri ise üreme kontrolü olarak kullanılmıştır.

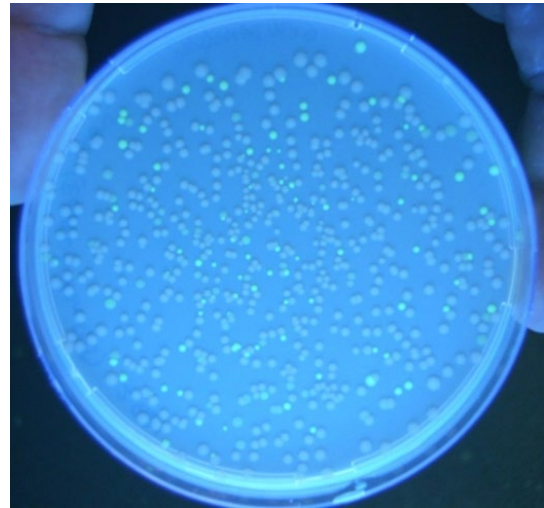
**Florometrik MİK tayini:** Öncelikle *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi için deneme gerçekleştirilmiştir. Mikroplaka okuyucu cihazda okuma yapılabilecek şeffaf renkli 96 kuyucuklu pleytte 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. Sıvı ortamdaki antibiyotik seyreltileri içerisinde sonraki aşamalarda bakteri kültüründen 5x10<sup>5</sup> cfu/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanmıştır. Birinci seride pUC18-*gfp* plazmidini içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi negatif kontrol grubu olarak hazırlanmıştır. İkinci seride pUC18-*gfp* plazmidini içeren *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi hazırlanmıştır. Üçüncü seride kloramfenikol, dördüncü seride ise gentamisin antibiyotik dilüsyonu 0.06 µg/ml - 128 µg/ml konsantrasyonları arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. Sonrasında, üçüncü ve dördüncü serilerdeki her bir antibiyotik dilüsyonu üzerine *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi eklenmiştir. Ölçümler için, transilluminator (Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu, Thermo) Ex:485/Em:538 nm olarak ayarlanmış ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm almak üzere programlanmıştır.

*E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi kullanılarak gerçekleştirilen deneme için de 96 kuyucuklu pleytte 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik seri seyreltmeleri hazırlanmış ve sonraki aşamalarda bakteri kültüründen 5x10<sup>5</sup> cfu/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanmıştır. Birinci seride pAT392-*gfp* plazmidini içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi negatif kontrol grubu olarak hazırlanmıştır. İkinci seride pAT392-*gfp* plazmidini içeren *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi hazırlanmıştır. Üçüncü seride kloramfenikol, dördüncü seride ise

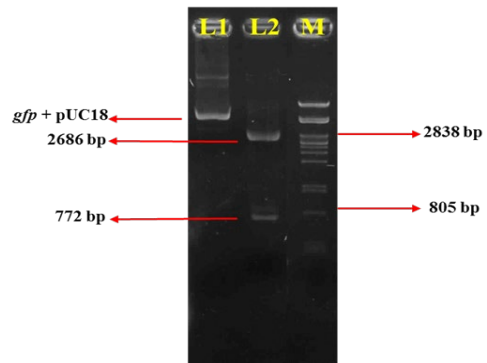
siprofloksasin olacak şekilde 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik dilüsyonları hazırlanmıştır. Ardından üçüncü ve dördüncü serilerdeki her bir antibiyotik dilüsyonlarının üzerine *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi olacak şekilde eklenmiştir. pAT392 plazmidinde *aacaph* geni varlığından dolayı gentamisine dirençli olduğundan gentamisin antibiyotigi için ölçüm yapılmamıştır. Ölçümler için, transilluminator (Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu, Thermo) 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm almak üzere programlanmıştır.

## BULGULAR

***gfp* geninin klonlanması ve plazmid konstrüksiyonu:** Bu çalışmada, green floresan proteini (GFP) kodlayan *gfp* geni, pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmıştır. Klonlama sonrasında elde edilen petride *gfp* genini alan rekombinant bakteriler Şekil 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1:** *gfp* genini almış rekombinant bakteriler transilluminator cihazında UV altında yeşil renkte görünmektedir.



**Şekil 2:** Plazmid restriksiyonu sonrası insert ve plazmidin incelenmesi. L1: pUC18-*gfp* plazmidinin kesilmeden elektroforez görüntüsü. L2: pUC18-*gfp* plazmidinin KpnI ve BamHI enzimleriyle kesimi sonrası oluşan elektroforez görüntüsü. M: Lambda-PstI marker görüntüsü.

Elde edilen rekombinant bakterilerden plazmid üzerindeki insertin gösterilmesi amacıyla KpnI ve BamHI enzimleriyle kesim sonrasında oluşan elektroforez görüntüsünde, Şekil 2'de görüldüğü gibi 772 bp olarak *gfp* geni, 2686 bp olarak gösterilen ise pUC18 plazmididir. pAT392 plazmidine *gfp* geninin klonlanması için de restriksiyon, ligasyon, transformasyon ve seçici besiyerinde rekombinant kolonilerin seçimi işlemleri tekrarlanmıştır. Ardından elde edilen ve transilluminator cihazında UV ışığı altında yeşil ışımaya yapan kolonilerden PCR yoluyla genin varlığı ve restriksiyon analiziyle insertin varlığı doğrulanmıştır.

**Konvensiyonel Mik ve floresans absorbansa dayalı Mik ölçümleri:** *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* ve *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterileri için CLSI rehberindeki protokole göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile konvensiyonel Mik ölçümü gerçekleştirilmiştir. Buna göre, *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* bakterisinde kloramfenikol için 2 µg/mL, siprofloksasin için ≤0,06 µg/mL, gentamisin için 1 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1). *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterisinde ise kloramfenikol için 2 µg/mL, siprofloksasin için ≤0,06 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1).

**Tablo 1.** Konvensiyonel Mik değerleri

Antibiyotikler	Konvensiyonel Mik	
	<i>E. coli</i> DH10BQpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BQpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)
Kloramfenikol	2	2
Siprofloksasin	≤0,06	≤0,06
Gentamisin	1	(Belirlenmedi)

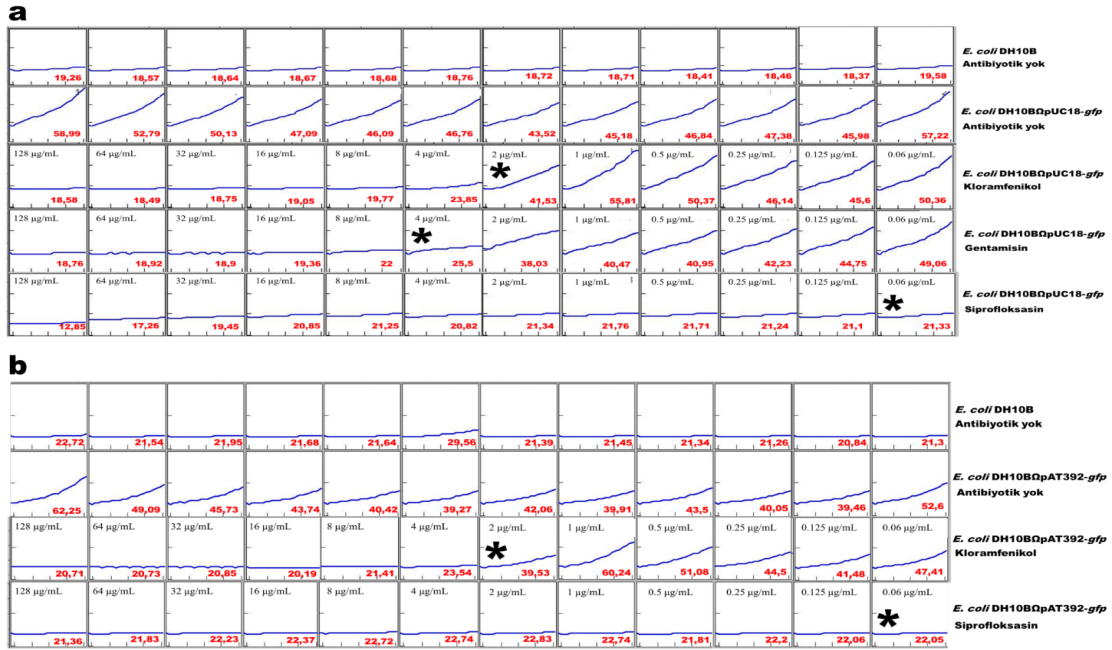
Konvensiyonel Mik ölçümlerinin gerçekleştirilmesinin ardından florometrik absorbans ölçümüne dayalı Mik belirlenmesi için mikropalak okuyucuda Ex:485/Em:538 ölçüm aralığında 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm alınmıştır. Bu işlemde *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* ve *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için ayrı ayrı elde edilen sonuçlar Şekil 3a ve Şekil 3b'de gösterilmiştir. Cihaza yüklenen plakda antibiyotik içermeyen on iki kuyucukdaki seride 24. saatte plazmid içermeyen *E. coli* DH10B bakterisinin inoküle edildiği kuyucuklardaki florometrik absorbans değerleri sırasıyla 19,58; 18,37; 18,46; 18,41; 18,71; 18,72; 18,76; 18,68; 18,67; 18,64; 18,57; 19,26 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Antibiyotik içermeyen kuyucuklara floresans ölçüm süresince pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için elde edilen florometrik absorbans değerleri sırasıyla

57,22; 45,98; 47,38; 46,84; 45,18; 43,52; 46,76; 46,09; 47,09; 50,13; 52,79; 58,99 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Kuyucuklarda hazırlanmış olan 0.06 µg/ml'den 128 µg/ml konsantrasyona kadar kloramfenikol antibiyotikini ve inoküle edilmiş *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için elde edilen floresans absorbans değerleri sırasıyla 18,58; 18,49; 18,75; 19,05; 19,77; 23,85; 41,53; 55,81; 50,37; 46,14; 45,6; 50,36 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Gentamisin antibiyotik için aynı antibiyotik konsantrasyon aralığında sırasıyla 18,76; 18,92; 18,9; 19,36; 22; 25,5; 40,47; 38,03; 40,95; 42,23; 44,75; 49,06 olarak ölçülmüş, Siprofloksasin için ise florometrik absorbans değerleri 12,85; 17,26; 19,45; 20,85; 21,25; 20,82; 21,34; 21,76; 21,71; 21,24; 21,1; 21,33 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a).

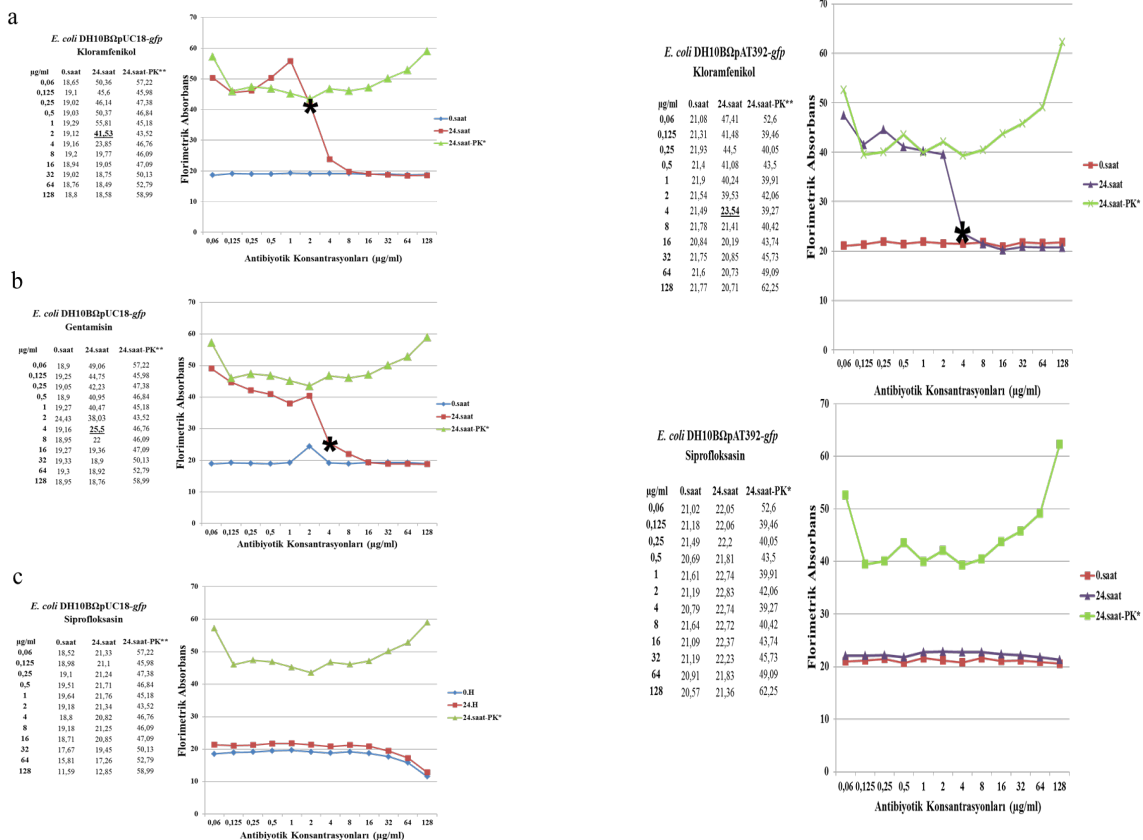
*E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için gerçekleştirilen ölçümlerde florometrik absorbansın negatif kontrolü olarak plazmid içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi kullanılmış ve 24. Saat sonunda elde edilen ölçüm değerleri 22,72; 21,54; 21,95; 21,68; 21,64; 29,56; 21,39; 21,45; 21,34; 21,26; 20,84; 21,3 olarak ölçülmüştür (Şekil 3b). Antibiyotiksiz ortamda pozitif kontrol olan rekombinant *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için florometrik absorbans ölçümleri 62,25; 49,09; 45,73; 43,74; 40,42; 39,27; 42,06; 39,91; 43,5; 40,05; 39,46; 52,6 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3b). Kloramfenikol antibiyotik için 0.06 µg/ml'den 128 µg/ml aralığında antibiyotik dilüsyonu hazırlanmış kuyucuklara *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* eklenerek gerçekleşen ölçüm sonrası 20,71; 20,73; 20,85; 20,19; 21,41; 23,54; 39,53; 40,24; 41,08; 44,5; 41,48; 47,41 florometrik absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 3b). Siprofloksasin için ölçülen değerler 21,36; 21,83; 22,23; 22,37; 22,72; 22,74; 22,83; 22,74; 21,81; 22,2; 22,06; 22,05 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3b).

Florometrik absorbans ile Mik belirlenmeye çalışılırken ayrıca 0. saat ile 24. saat absorbans değerlerinin pozitif kontrol ile birlikte, antibiyotik konsantrasyonlarına göre oluşturduğu değişimin grafiksel durumundan da faydalanıldı. Buna göre Şekil 4'de *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* için ve Şekil 5'de ise *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için florometrik absorbansın keskin bir şekilde en az 10 ışık birimi azaldığı yer Mik değerini vermektedir.

Florometrik absorbans ölçümüne dayalı yöntem ile elde edilen verilere göre *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* bakterisi için floresans Mik (FL-Mik) değerleri kloramfenikol için 2 µg/ml, gentamisin için 4 µg/ml ve siprofloksasin için <0,06 µg/ml olarak bulunmuştur. *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterisi için floresans Mik (FL-Mik) değerleri ise kloramfenikol için 2 µg/ml ve siprofloksasin için <0,06 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 3a, Şekil 3b, Şekil 4, Şekil 5 ve Tablo 2).



**Şekil 3.** Mikroplak okuyucu cihazında florimetrik absorbans çıktılarının alınması. Mavi renkle ilerleyen çizgi 24 saat süresince ışığın absorbansına göre şekillenmektedir. Kırmızı renkli rakamlar absorbans değerlerini göstermektedir. Ayrıca her bir kuyucuğu temsil eden kareler içerisinde yer alan antibiyotik konsantrasyonu da belirtilmiştir. a: Kloramfenikol, gentamisin ve siprofloksasin antibiyotikleri için *E. coli* DH10BΔpUC18-gfp bakterisinde mikroplak okuyucu cihazında konsantrasyona bağlı olarak elde edilen değerler b: Kloramfenikol, ve siprofloksasin antibiyotikleri için *E. coli* DH10BΔpAT392-gfp bakterisinde mikroplak okuyucu cihazında konsantrasyona bağlı olarak elde edilen değerler \*: Florimetrik absorbansa göre elde edilen MİK değerini göstermektedir.



**Şekil 4:** *E. coli* DH10BΔpUC18-gfp bakterisi için antibiyotik konsantrasyonlarına göre florimetrik absorbans değerlerinin izlenmesi. 24. saatte meydana gelen en az 10 ışık birimi düşüş MİK değerini vermiştir. a: Kloramfenikol için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri. b: Gentamisin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri. c: Siprofloksasin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri \*: MİK değeri, PK\*\*: Pozitif kontrol absorbans değerleri (*E. coli* DH10BΔpUC18-gfp).

**Şekil 5.** *E. coli* DH10BΔpAT392-gfp bakterisi için antibiyotik konsantrasyonlarına göre florimetrik absorbans değerlerinin izlenmesi. 24. saatte meydana gelen en az 10 ışık birimi düşüş MİK değerini vermiştir. a: Kloramfenikol için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri b: Siprofloksasin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri \*: MİK değeri, PK\*\*: Pozitif kontrol absorbans değerleri (*E. coli* DH10BΔpAT392-gfp).

Tablo 2. Konvansiyonel ve FL-MİK karşılaştırılması

Antibiyotikler	Konvansiyonel MİK	FL-MİK	Konvansiyonel MİK	FL-MİK
	<i>E. coli</i> DH10BΩpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)
Kloramfenikol	2	2	2	2
Siprofloksasin	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06
Gentamisin	1	4	(Belirlenmedi)	(Belirlenmedi)

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda, *gfp* geni pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmış ve aktarıldığı *E. coli* DH10B bakterisinde konvansiyonel ve florometrik MİK ölçümleri yapılmıştır. Florometrik absorbans temelindeki MİK yöntemiyle konvansiyonel MİK ölçümü karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Konvansiyonel ve florometrik MİK ölçümlerinin maksimum 2 dilüsyon fark olduğu bulunmuştur.

GFP ve benzeri floresans özellikli proteinlerden yararlanılarak hücrelerin fizyolojisinin farklı koşullardaki cevapları, hücre içi proteinlerin varlığı, ekspresyonu gibi birçok uzun yıllardır konuda çalışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kimyasal birtakım maddeler uygulandığında bakterilerin flagellaları gibi büyük moleküler makinelerinin formasyonlarındaki değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla GFP 'nin floresans özelliğinden yararlanılmıştır (Kalir ve ark., 2001).

Hücre içindeki farklı protein gruplarının dinamiklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen başka bir çalışmada, bazı protein grupları GFP ile işaretlenerek, normal ve değişken koşullardaki kimyasal inhibitörler, mutasyonlar ve gen inhibisyonlarındaki durumlar incelenmiştir (Ellenberg ve ark., 1998). Makrolid antibiyotikle ile yapılmış bir çalışmada da *gfp* geninin aktarıldığı bakteride farklı grup makrolidlerin indüklemeye kapasiteleri disk difüzyon metodu kullanılarak UV altındaki ışımaya ile gözlenmeye çalışılmıştır (Clarebout ve Leclercq, 2002). GFP tabanlı florometrik yöntem kullanılarak T4 ve T7 endolizinlerinin bakteri hücreleri üzerinde etkili olduğu optimal pH, tuz ve metal iyonları konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik çalışmada da florometrik absorbans ölçümünden yararlanılmıştır. Hücre lizisini hassas bir şekilde ölçebilecek bir yöntem olarak GFP ışımalarının florometrik tabanlı ölçümünün kullanılmasının uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (Sharma ve ark., 2019). Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotik hassasiyetlerini belirlemek önemli bir sorundur. Mozioglu yaptığı çalışmada MİK değerini saptamak

için floresans absorbansa dayalı yöntem ve GFP floresans emisyon ölçümlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak biyofilm içinde veya dışında, *P. aeruginosa* için antibiyotik MİK ölçümlerinin farklı olmadığı gösterilmiştir (Mozioglu, 2019). Yapılan diğer bir çalışmada araştırmacılar, floresans ışımaya yoluyla nükleaz aktivitesini belirlemişlerdir. Taqman tarzı prob oluşturmuşlar ve nükleaz aktivitesiyle floresan madde quencherden ayrılınca artan ışımaya nükleaz aktivitesini ifade ettiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar kültür ortamında MİK belirlenmesi için floresans tabanlı bir yöntem kullanılabileceğini de vurgulamıştır (Mozioglu ve ark., 2019).

Konvansiyonel MİK belirlenmesine dayalı metotlarda sıvı besiyerinde oluşan bulanıklık ya da agarda oluşan bakteri kolonileri değerlendirilmektedir. Bizim çalışmamızda ise ışığın absorbansını saptama yoluyla 485/535 nm dalga boyu aralığında florometrik absorbans ölçüm yöntemi kullanılmıştır. İki farklı plazmid kullanılmış ancak MİK sonuçlarında farklılık saptanmamıştır. Kullanılmış olan bu iki plazmidde ekspresyon miktarlarının farklılığına bağlı MİK değişikliği olup olmadığı test edilmiş ancak test edilen antibiyotikler için belirgin bir farka rastlanmamıştır.

Antibiyotik geliştirmede en önemli aşamalardan birisi aday molekülün bakteriler üzerindeki etkilerinin gözlenmesidir. Bu aşamada kullanılabilecek basit, ucuz ve kolay bir yöntemin ortaya konulması aday moleküllerin daha hızlı ve etkin şekilde değerlendirilmesini sağlayacaktır. Yalnızca moleküllerin değil bakteriler üzerinde, hayvanlardan, mikroorganizmalardan ve bitkilerden elde edilecek özütlere etkilerinin çabuk ve kolay bir yöntemle test edilmesi sağlanabilecektir. Bu çalışma ile antimikrobiyal maddelerin MİK değerinin doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlenmesini sağlayan, kullanımı kolay bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem konvansiyonel metotla karşılaştırılmıştır. Yeni geliştirilecek antimikrobiyallerin ya da bakteriler üzerine etkisi test edilecek farklı ürünlerin *gfp* geni gibi floresans genlerin aktarıldığı test organizmalarına karşı etkisi oldukça hassas olarak ölçülebilecektir. Yöntemin sınırlayıcı yönü, floresan

genlerle dönüştürülmüş bakterilerin kullanılacak olmasıdır.

## Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası: 109T948)

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2020: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/advanced-information/>. Erişim tarihi; 19/05/2020.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C, 1994: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Clarebout G, Leclercq R, 2002: Fluorescence assay for studying the ability of macrolides to induce production of ribosomal methylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(7), 2269-2272.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2014: Twenty-first Informational Supplement. CLSI Document M100-S21. CLSI, Wayne, PA.
- Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG, 1998: Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(2):344-347.
- Elf J, Li GW, Xie XS, 2007: Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science*, 316(5828), 1191-1194.
- Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J, Presley JF, 1998: Two-color green fluorescent protein time-lapse imaging. *Biotechniques*.25(5):838-846.
- Kalir S, McClure J, Pabbaraju K, Southward C, Ronen M, Leibler S, et al, 2001: Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science*. 292: 2080–2083.
- Mozioglu E, 2019: Fluorescence-based real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* and a simple, continuous screening method for detection of antibiofilm activity. *Int. J. Environmen. An. Ch.* DOI: 10.1080/03067319.2019.1685091
- Mozioglu E, Akyürek S, Gündüz S, Akgoz M, Gören AC, Kocagöz T, 2019: Oligomer based real-time detection of microorganisms producing nuclease enzymes. *Analyst*, 144(4), 1379-1385.
- Salih H, Oryaşın E, Bozdoğan B, 2020: pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 50 (1):027-034.
- Sharma M, Tyagi JL, Poluri KM, 2019: Quantifying bacterial cell lysis using GFP based fluorimetric assay. *Int. J. Biol. Macromol.* 138, 881-889.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y, 1962: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Physiol.*, 59, 223-239.
- Xie XS, Choi PJ, Li GW, Lee NK, Lia G, 2008: Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 417-444.

**\*Yazışma Adresi:** Erman Oryaşın

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın,-Türkiye  
**e-mail:** ermanoryasin@gmail.com

## Simental Irkı Bir Buzağdaki Üretral Dilatasyon Olgusunun Klinik, Radyolojik, Ultrasonografik Tanısı ve Tedavisi

Cihan GÜNAY<sup>1,a</sup>, Eren POLAT<sup>1,b,\*</sup>, Aydın SAĞLIYAN<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0476-6164, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-3999-1310, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-8226-0740

Geliş Tarihi: 13.02.2020

Kabul Tarihi: 06.05.2020

**Özet:** Bu olgu sunumunda, 4 günlük simental ırkı erkek bir buzağda karşılaşılan üretral dilatasyon olgusunun klinik, radyografik, ultrasonografik tanısı ve tedavisi tanımlandı. Klinik muayenesinde disüri ve perineal bölgede içeriği idrar olan bir şişkinlik tespit edilen buzağın yapılan radyografik ve ultrasonografik muayenesi sonucu üretral dilatasyonu olduğu tespit edildi. Genel anestezi altında, şişkinlik bulunan bölge üzerinde 6 cm uzunluğunda bir ensizyon yapıldıktan sonra, deri katmanı geçilerek dilatasyonun olduğu bölgeye ulaşıldı. İdrarın boşaltılmasının ardından, üretranın dilate olan alanı daraltılarak üretrostomi işlemi yapıldı. Operasyon sonrası hayvana postoperatif olarak 7 gün parenteral antibiyotik uygulandı. Operasyonu takiben ilk hafta sadece üretrostomi yapılan bölgeden idrarını yapan buzağın sonraki süreçte idrarını penisten de yapmaya başladığı gözlemlendi. Bu sebeple üretrostomi ile oluşturulan açıklık kapatılarak hayvan kontrol altına alındı. Bir ay sonra hasta sahibi ile yapılan görüşmede hayvanın sağlık durumunun iyi olduğu öğrenildi.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Konjenital, Üretral dilatasyon, Üretrostomi

### Clinical, Radiological, Ultrasonographic Diagnosis and Treatment of Urethral Dilatation Case in a Simental Calf

**Abstract:** In this case report, the clinical, radiographic, ultrasonographic diagnosis, and treatment of the urethral dilatation case encountered in a 4-day, simental, male calf were discussed. In the clinical examination of the calf, after the presence of dysuria and a swelling that contained urine in the perineal region, urethral dilatation was detected as a result of the radiographic and ultrasonographic examination. Under general anesthesia, after a 6 cm incision was made on the area with swelling, the area where the dilatation was reached was passed bypassing the skin layer. After draining the urine, urethrostomy was performed by narrowing the dilated area of the urethra. After the operation, the animal was administered parenteral antibiotics 7 days postoperatively. Following the operation, it was observed that the calf, which urinated only from the urethrostomal region in the first week, made urine from the penis in the next process. For this reason, the hole created by urethrostomy was closed and the animal was taken under control. One month later, during the meeting with the owner, it was learned that the animal was in good health.

**Keywords:** Calf, Congenital, Urethral dilatation, Urethrostomy.

### Giriş

Ürogenital sistem anomalileri sindirim sistemi anomalileri ile birlikte gerek buzağlarda gerek ise diğer evcil hayvanlarda en çok karşılaşılan konjenital anomaliler arasında yer almaktadır (Chauhan ve ark., 2011; Durmuş ve Polat, 2019; Özyaydın ve ark., 2016; Varol ve ark., 2018; Yayla ve ark., 2016). Üretral dilatasyonun patogenezisinde, diğer konjenital anomalilerde olduğu gibi genetik faktörler, intrauterin dönemdeki enfeksiyöz hastalıklar, gebelik sırasında oluşan intoksikasyonlar ve gebeliğin erken döneminde yapılan rektal muayeneler yatmaktadır (Bademkiran ve ark., 2009; Baran ve ark., 2015; Chauhan ve ark., 2011; Durmuş ve Polat, 2019; Özyaydın ve ark., 2016; Öztürk ve ark., 2002; Varol ve ark., 2018; Yayla ve ark., 2016). Bazı araştırmacılar ise geçici üretral obstrüksiyonlarında üretral dilatasyona sebep

olabileceğini bildirmişlerdir (Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002).

Üretral dilatasyon olgularında hastanın perineal bölgesinde fluktuant, ağrısız bir şişlik ile beraber disüri ya da anüri gibi klinik bulgulara rastlanmaktadır (Anderson, 1993; Baran ve ark., 2015; Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002; Yayla ve ark., 2016). Direkt ve indirekt radyografik yöntemler ile ultrasonografi kullanılarak klinik bulgular desteklenip hastalığın tanısı yapılabilmektedir (Anderson, 1993; Baran ve ark., 2015; Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002; Vogel ve ark., 2011; Yayla ve ark., 2016). Bölgenin ultrasonografik incelemesinde, geniş lümeneye sahip, postskrotal bölgeye doğru uzanan, hipoekoik bir şişliğin olduğu görülür (Yayla ve ark., 2016). Üretral dilatasyonun tedavisi çoğunlukla üretrostomi veya dilate olan bölgenin eksizyonu ile



yapılmaktadır (Anderson, 1993; Hussein, 2011; Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002; Vogel ve ark., 2011; Yayla ve ark., 2016).

Bu olgu sunumunda 4 günlük, simental ırkı, erkek bir buzağıda karşılaşılan üretral dilatasyon olgusunun klinik, radyografik, ultrasonografik tanısı ve tedavisi rapor edildi.

### Olgu Tanımı

Bu olgu sunumunun konusunu, Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Anabilim Dalı'na idrar yapmada güçlük ve perineal bölgede şişkinlik şikâyetiyle getirilen 4 günlük, simental ırkı, erkek bir buzağı oluşturdu.

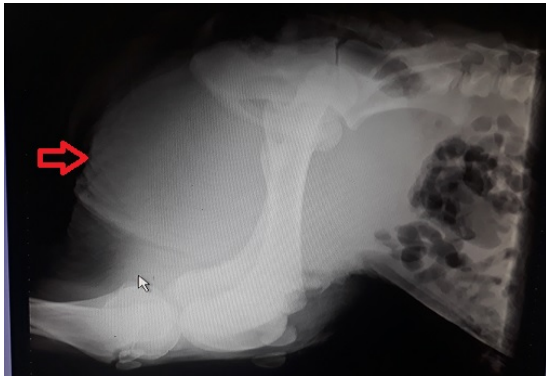
Hayvana yapılan klinik muayenede, buzağının perineal bölgesinde fluktuan bir şişkinlik olduğu (Resim 1) ve disüri durumunun bulunduğu tespit



Resim 1. Buzağının perineal bölgesinde fluktuan bir şişkinlik (a,b).

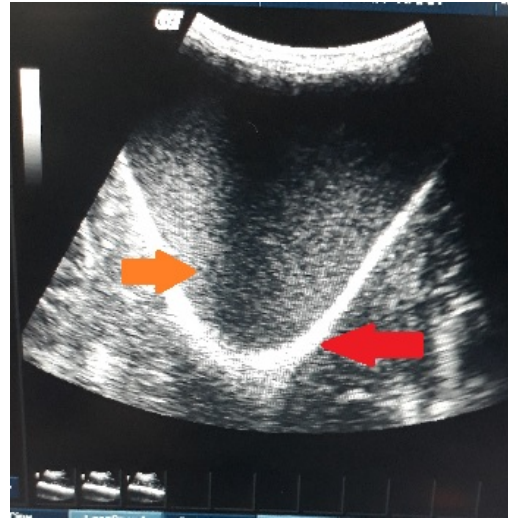
edildi. Fluktuan şişkinliğe palpasyon yapıldığında idrar akışının arttığı gözlemlendi. Yapılan punksiyon işlemi sonucunda şişkinlik içerisinden bulanık karakterde idrar geldiği tespit edildi.

Yapılan direkt radyografik muayenede postskrotal bölgede lümenli bir şişkinlik olduğu tespit edildi (Resim 2).



Resim 2. Direkt radyografik muayenede postskrotal bölgedeki şişkinliğin görüntüsü (kırmızı ok).

İndirekt radyografi uygulaması amacıyla 10 ml iopromid içeren pozitif kontrast madde (*Ultravist, Bayern, 623 mg/ml*) intravenöz yolla buzağıya verildi. Kontrast maddenin verilmesinden sonra 15. ve 30. dakikalarda alınan radyografilerde üriner sistem organlarına kontrast maddenin geçmediği tespit edildi. Yapılan ultrasonografik muayenede ise, buzağının postskrotal bölgesinde, geniş lümenli sahip, kalın duvarlı, içi hipoekoik bir sıvı ile dolu olan, çevre dokulardan rahatlıkla ayırt edilebilen ve idrar kesesini andıran bir şişkinlik olduğu tespit edildi (Resim 3). Yapılan muayeneler sonucunda buzağıya üretral dilatasyon tanısı konuldu.



Resim 3. Postskrotal bölgedeki şişkinliğin ultrasonografi görüntüsü. Dilate üretranın kalınlaşan duvarı (kırmızı ok), Dilate üretral bölgede biriken idrar görüntüsü (turuncu ok)

Üretral dilatasyon tanısı konulan buzağıya operatif olarak müdahale edilmesine karar verildi. Operasyon için hayvana sedasyon amacıyla 0.2 mg/kg dozunda ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, 23.32 mg/ml) intramuskuler yolla verildi. Buzağıya ksilazin hidroklorür uygulamasından 10 dakika sonra 4 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketasol %10, İnterhas, 100 mg/ml) verilerek genel anesteziye alındı. Sternal pozisyonda operasyon masasına alınan hayvanın perineal bölgesinin traş ve dezenfeksiyonunu takiben operasyon bölgesi serviyet örtüleriyle sınırlandırıldı. Perineal bölgedeki şişkinliğin etrafına lidokain hidroklorür (Vilcain, Vilsan, 20 mg/ml) kullanılarak lokal infiltrasyon anestezisi yapıldı.

Perineal bölgedeki şişkinlik üzerinde 6 cm uzunluğunda bir ensizyon yapılarak deri katmanı geçildi ve küt diseksiyon ile üretranın dilate olduğu bölgeye ulaşıldı. Üretranın dilate olan kısmı ensize edilip idrar boşaltıldıktan sonra, üretranın dilate olan kısmı eksize edilerek daraltıldı. Hayvan tamamen iyileşene kadar idrar yapmada güçlük yaşamaması için üretra sirküler olarak emilebilir



sütür materyaliyle (Vicryl, USP 2/0) deriye tespit edilerek üretrastomi işlemi gerçekleştirildi. Hayvanın genel durumunun acil olmasından ve uygun büyüklükte sonda bulunmamasından dolayı gerek operasyon sırasında gerek postoperatif olarak sonda uygulaması yapılamadı. Fakat ne operasyon sırasında ne sonrasında bu durumdan kaynaklı komplikasyona rastlanmadı.

Operasyon sonrası hayvana 7 gün boyunca 8.75 mg/kg dozunda amoksisilin-klavunik asit (Synulox, Pfizer, 175 mg/ml) uygulandı. Operasyonu takiben ilk hafta sadece üretrastomi yapılan bölgeden idrarını yapan buzağının sonraki süreçte idrarını penisten de yaptığı gözlemlendi. Bu sebeple üretrastomi ile oluşturulan açıklık kapatılarak hayvan kontrol altına alındı. Bir ay sonra hasta sahibi ile yapılan görüşmede hayvanın sağlık durumunun iyi olduğu öğrenildi.

### Tartışma ve Sonuç

Ürogenital sistem anomalileri, gerek buzağılarda gerekse diğer evcil hayvanlarda sindirim sistemi anomalileri ile birlikte en çok karşılaşılan konjenital anomalilerdir (Chauhan ve ark., 2011; Durmuş ve Polat, 2019; Özyayın ve ark., 2016; Varol ve ark., 2018; Yayla ve ark., 2016). Kaya ve ark. (2011), buzağılarda karşılaşılan konjenital anomalilerin %7.22'sini üriner sistem anomalilerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yine Aksoy ve ark. (2006) ise, ruminantlarda konjenital anomalilerin %7.3'ünü üriner sistem anomalilerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu olgu sunumunda da 4 günlük, erkek, simental ırkı bir buzağıda karşılaşılan üretral dilatasyon olgusu konu edildi.

Ürogenital sistemin konjenital anomalileri çoğunlukla multiple olgular şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Üretral dilatasyon olgularının da çoğunlukla bu durumla uyumluluk gösterdiği bilinmektedir. Baran ve ark. (2015), biri bir günlük diğeri on günlük iki oğlakta penis aplazisi ve fimozis ile birlikte şekillenen üretral dilatasyon olgusunu bildirmişlerdir. Öztürk ve ark. (2002), üç günlük, Montofon ırkı, erkek bir buzağıda penis aplazisi ve anorşidizm ile birlikte gelişen üretral dilatasyon olgusunu bildirmişlerdir. Yine Yayla ve ark. (2016) ise, bir aylık, Simental ırkı, erkek bir buzağıda rektoüretral fistül ve segmental üretral agenezi ile birlikte şekillenen üretral dilatasyon olgusunu bildirmişlerdir. Üretral dilatasyon nadiren tek bir olgu olarak görülebilmektedir. Anderson ve ark. (1993), dört aylık Charolais-cross ırkı, erkek bir buzağıda üretral dilatasyon olgusunun tek başına seyrettiğini bildirmişlerdir. Bu olgu sunumunda da üretral dilatasyon olgusu sıklıkla görüldüğü durumun aksine tek başına görülmesinden kaynaklı olması yönüyle önem arz etmektedir.

Üretral dilatasyon olgularında, hastanın perineal bölgesinde fluktuant, ağrısız bir şişlik ile beraber disüri ya da anüri gibi klinik bulgulara rastlanmaktadır (Anderson, 1993; Baran ve ark., 2015; Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002; Yayla ve ark., 2016). Sunulan bu olguda da klinik bulguların diğer üretral dilatasyon olgularında gözlenen klinik bulgular ile uyumluluk gösterdiği görüldü. Radyografik muayenede dilatasyonun şekillendiği bölgeye göre farklı araştırmacılar farklı bulgular tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Öztürk ve ark. (2002), perineal bölgedeki şişkinlik içerisinde 20 ml meglumine-sodyum diatrizoate maddesini vererek aldıkları kontrast radyografide, üretranın ischial bölgede sonlandığını ve kısa üretra bölümünde dilatasyon şekillendiğini bildirmişlerdir. Baran ve ark. (2015), üretral dilatasyonu olan iki oğlakta intravenöz pyelografi ile tanıya gitmek istemişler fakat herhangi bir anormalliteye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu olgu sunumunda da üretral dilatasyon şüphesi olan buzağıya hem direkt hem indirekt radyografi uygulaması yapıldı. Direkt radyografide postskrotal bölgede yumuşak doku benzeri kontrast veren bir şişkinlik olduğu; indirekt radyografide ise direkt radyografi bulgularını öteye götürecek bir anormalitenin bulunmadığı tespit edildi.

Üretral dilatasyonun tanısında ultrasonografik muayene önemli ipuçları vermektedir. Perineal bölgedeki şişkinliğin ultrasonografik incelemesinde postskrotal bölgeye yerleşmiş, geniş lümenli, kalın duvarlı, içerisinde hipoekoik görünümde sıvı olan bir yapının varlığı üretral dilatasyon tespitini güçlendirmektedir (Vogel ve ark., 2011; Yayla ve ark., 2016). Karşılaşılan bu olguda da perineal bölge üzerindeki şişkinliğin ultrasonografisinde; kalın duvarlı, hipoekoik görünümde içerik bulunan geniş lümenli idrar kesesini andıran bir yapı tespit edildi.

Üretral dilatasyon, çoğunlukla üretrastomi veya dilate olan bölgenin eksizyonu yapılarak tedavi edilmektedir (Anderson, 1993; Hussein, 2011; Marzok ve El-khodery, 2013; Öztürk ve ark., 2002; Vogel ve ark., 2011; Yayla ve ark., 2016). Öztürk ve ark. (2002), üretral dilatasyonlu Montofon ırkı bir buzağıya üretrastomi operasyonu yaptıklarını ve hayvanın bir ay sonra yapılan kontrollerinde sağlıklı şekilde yaşamını sürdürdüğünü bildirmişlerdir. Baran ve ark. (2015), üretral dilatasyonu ve fimozisi olan iki oğlağın penil üretrasını ampute ederek üretrastomi yaptıklarını ve herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmadıklarını bildirmişlerdir. Bu olgu sunumunda da üretranın dilate olan kısmı eksize edilip daraltıldıktan sonra üretrastomi işlemi yapılarak üretra deriye tespit edildi. Postoperatif birinci hafta sonunda hayvanın hem üretrastomi ile oluşturulan açıklıktan hem de penisten idrar yapması nedeniyle üretrastomi ile oluşturulan

açıklık dikilerek kapatıldı. Yapılan bir aylık kontroller sonrası herhangi bir komplikasyon şekillenmediği ve hayvanın hayatına normal şekilde devam ettiği saptandı.

Sonuç olarak, klinik muayene ile tespiti kolay görünen fakat üriner sistemdeki divertikül, üretra rupturu ve üriner sistemin diğer anomalileri ile karışma ihtimali yüksek olan üretral dilatasyon olgusunun klinik, radyografik, ultrasonografik bulgular ve tedavisi paylaşılarak saha şartlarında çalışan meslektaşlarımıza ışık tutulacağı ve literatüre katkı sağlanacağı düşünülmüştür.

### Kaynaklar

- Aksoy Ö, Kılıç E, Öztürk S, Özyayın İ, Kurt B, Baran V, 2006: Buzağı, kuzu ve oğlaklarda karşılaşılan doğmasal anomaliler: 1996-2005 (262) olgu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12(2), 147-154.
- Anderson DE, 1993: Urethral recess dilatation in Charolais-cross bull calf. *Can Vet J*, 34, 234-235.
- Baran V, Kılıç E, Yayla S, Karakurt E, 2015: İki oğlakta karşılaşılan üretral dilatasyon ve fimozis olgusu. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 4(1), 30-32.
- Bademkiran S, İçen H, Kurt D, 2009: Congenital rectovaginal fistula with atresia ani in a heifer. *YYÜ Vet Fak Derg*, 20(1), 61-64.
- Chauhan PM, Parmar VR, Patel TP, Thakor KB, Parikh SS, 2011: Atresia ani: a congenital defect and its successful management in non-descript calf. *IJAVMS*, 5(6), 520-522.
- Durmuş AS, Polat E, 2019: Simental ırkı bir buzağıda atresi ani ve rektouretral fistül olgusu. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 8(2), 246-248.
- Kaya M, Okumus Z, Doğan E, Çetin EM, Yanmaz LE, 2011: Erzurum Yöresindeki Buzağılarda Doğmasal Anomalilerin Görülme Sıklığı ve Sağkalım Oranları. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 25 (2), 83 – 93.
- Hussein KE, 2011: Surgical management of some congenital anomalies in ruminants. *Eurasian J Vet Sci*, 27(4), 245-249.
- Marzok MA, El-khodery S, 2013: A comparison of surgical out comes of perineal urethrostomy plus penile resection and perineal urethrostomy in twelve calves with perineal or prescrotal urethral dilatation. *Open Veterinary Journal*, 3(2), 106-113.
- Özyayın İ, Kılıç E, Aksoy Ö, Cihan M, Güngör E, 2006: Bir buzağıda üçlü malformasyon: atresi ani, rektouretral fistül ve pygomelia. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12(2), 189-191.
- Öztürk S, Kılıç E, Arancı A, Uyguntürk A, 2002: Montofon bir buzağıda aplazya penis, anorşidizm ve üretral dilatasyon olgusu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 8(1), 63-65.
- Varol K, Atalan G, Günes V, Alpman U, Yönez MK, 2018: A case of atresia ani in an anatolian water buffalo calf. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 15(3), 271-275.
- Vogel SR, Dore E, Breteau G, Desrochers A, Babkine M, Nichols S, 2011: Congenital enlargement of the suburethral diverticulum in a holstein calf. *Can Vet J*, 52, 173-176.
- Yayla S, Kılıç E, Baran V, Özen H, 2016: A case of congenital rectourethral fistula, urethral dilatation and segmental urethral agenesis encountered in a calf. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 5(1), 70-73.

\*Yazışma Adresi: Eren POLAT

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.

E-mail: erenpolat@firat.edu.tr

## Kök Hücreler ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları

Osman BULUT<sup>1,a,\*</sup> Ali BELGE<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Milas Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Milas, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-2773-8243, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-3346-6926

Geliş Tarihi: 10.01.2020

Kabul Tarihi: 16.06.2020

**Özet:** Kök hücreler kendilerini yenileme özelliğine sahip olup, özel koşullar altında farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre; totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücreler olarak sınıflandırılırken, embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu derlemede kök hücrelerin genel özellikleri ile kök hücre tiplerinden bahsedilerek veteriner hekimlikte kullanım alanları hakkında özlü bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kök hücreler, Kök hücre tipleri, Veteriner hekimlik

### The Stem Cells and Their Usage In Veterinary Medicine

**Abstract:** Stem cells have the ability to regenerate themselves, and when they are induced appropriately, can differentiate to many specialized cell types in the body and laboratory environments. Stem cells are classified as totipotent, pluripotent and multipotent stem cells based on their differentiation characteristics. In addition, they are divided into two main groups of embryonic and non-embryonic stem cells. In this review, we aimed to give concise information about general characteristics, stem cell types and their applications in veterinary areas.

**Keywords:** Stem cells, Stem cell types, Veterinary medicine

### Giriş

Heterojen üreme potansiyeline sahip ve fonksiyonel olarak farklılaşmamış hücre olarak tanımlanan kök hücreler, organizmadaki ilk hücreler olarak bilinmektedir (Şimşek, 2012). Kök hücreler kendilerini yenileme özelliğine sahip olup, özel koşullar altında farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedir (Sağsöz ve Ketani, 2008). Temel kök hücre kaynakları; erişkin kök hücreler, kordon kanından elde edilen kök hücreler ve embriyonik kök hücreler şeklinde sıralanmaktadır (Şahin ve ark., 2005).

#### Kök Hücrelerin Özellikleri

Kök hücreleri normal hücrelerden ayıran 3 temel özellik bulunmaktadır. Bunlardan ilki normal hücreler sınırlı sayıda çoğalabilirken, kök hücreler sonsuz bölünme ve çoğalma yeteneğine sahiptir. İkincisi normal hücreler bir görevi yapmak üzere özelleşmişken, kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir. Son olarak normal hücreler bir başka hücre tipine farklılaşamazken kök hücreler birçok farklı hücreye dönüşebilmektedirler (Bianco ve ark., 2013). Kök hücrelerin farklı hücre türlerine dönüşebilme özelliğine plastisite adı verilmektedir. Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre; totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Gattegno-Ho ve ark., 2012).

**Totipotent Kök Hücreler;** Totipotent kelime olarak “her şey olma” anlamında kullanılmaktadır. Tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip embriyonal blastula hücresi “totipotent” hücre grubuna dahildir (Kalra ve Tomar, 2014). Bu hücreler; embriyonal hücrelere, embriyonal zarlara, erişkin tüm doku ve organlara farklılaşabilme özelliğine sahiptirler (Karaşahin, 2012).

**Pluripotent Kök Hücreler;** Fertilizasyonun 5. gününden itibaren, totipotent hücreler değişim göstererek, endoderm ve ektoderm tabakalarını oluştururlar. Yeni oluşan bu yapıya “blastosist” adı verilir. Blastosistin ektoderminden, embriyonun beslenmesi ve solunumunu sağlayacak olan plasenta ile yavruyu saran chorion kesesi gelişirken, endoderm tabakasından göz, kalp, beyin gibi iç organlar ile kaslar ve kemikler gelişir (Thore ve ark., 2008). Blastosistin endodermdeki hücreler pluripotent kök hücreler sınıfına aittir. Bu hücreler erken gelişim döneminde bulunurlar ve organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturarak vücudun herhangi bir tür hücresine dönüşme yeteneğine sahiptirler. Pluripotent kök hücrelere aynı zamanda embriyonik kök hücreler de denilmektedir (Thomson ve ark., 1998).

**Multipotent Kök Hücreler;** Pluripotent kök hücre aşamasından sonraki hücre tipleri multipotent kök hücreler ya da erişkin kök hücreler olarak adlandırılmaktadır. Multipotent kök hücre tipine verilebilecek en iyi örnek hematopoetik kök hücrelerdir (Ural, 2006). Bu hücreler özel koşullar altında çok daha fazla hücre türüne dönüşebilmektedir. Örneğin kan kök hücreleri sinir hücrelerine dönüşebilmektedir. Bununla birlikte multipotent kök hücre tipleri mezenkimal kök hücreler olarak kabul edilmektedir (Thomson ve ark., 1998).

#### **Kök Hücrelerin Sınıflandırılması**

- Embriyonik kök hücreler

- Embriyonik olmayan kök hücreler

1- Erişkin kök hücreleri

a) Hematopoetik kök hücreleri

I. Kemik iliği kök hücreler

II. Periferik kan kök hücreler

III. Kordon kanı kök hücreler

b) Stromal kök hücreler

c) Organlardaki kök hücreler

2- Fötal kök hücreler

3- Kadavra kök hücreleri (Sağsöz ve Ketani, 2008)

#### **Embriyonik kök hücreler**

Sperm ile yumurtanın döllenmesi sonucu organizmanın ilk hücresi oluşmaktadır. Daha sonra bu ilk hücre bölünerek 2, 4, 8 hücre oluşturur ve sayısını ikiye katlayarak 4 günün sonunda canlı organizmayı meydana getirecek güce sahip olur. Embriyonik kök hücreler blastosit adı verilen ve anne karnında gelişen hücre topluluğundan alınan hücrelerin her biri için ifade edilmektedir (Webster ve ark., 2012). Embriyonik kök hücreler, deneysel olarak yumurtalardan elde edilen embriyolardan alınır. Bu hücreler özel koşullar altında çoğaltılabilmekte ve dondurularak saklanabilmektedir (Thomson ve ark., 1998). Embriyonik kök hücreler hızlı çoğalabilmekte ve organizma için yenilenebilir kaynak oluşturmaktadır (Thore ve ark., 2008). Embriyonik kök hücrelerin yaygın olarak kullanıldığı hastalıklar; karaciğer ve kalp hastalıkları, diyabet, merkezi sinir sistemi hastalıkları şeklinde sıralanabilmektedir (Juopperi, 2012).

#### **Embriyonik olmayan kök hücreler**

##### **1. Erişkin kök hücreler (postnatal kök hücre)**

Embriyo, sekiz haftalık gelişim evresinden sonra fetüs halini alır ve erişkin kök hücreleri oluşmaya başlar. Erişkin kök hücreler organizmada

ölen ya da zarar görmüş hücre tiplerine farklılaşır ve çoğalabilirler. Bu sayede alternatif hücre tipleri olarak görev yapmaktadırlar (Clevers, 2015). Erişkin kök hücreler birçok dokuda bulunurken birçok dokuların oluşumunda da katkıda bulunabilmektedirler (Perin ve ark., 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalarda erişkin kök hücrelerin tamamen farklı bir dokunun hücrelerine farklılaşabileceği gösterilmiştir. Bu olaya plastisite adı verilmektedir. Örneğin; kan hücrelerine farklılaşmaya yönlendirilmiş olan hematopoetik kök hücreleri; sinir hücreleri, karaciğer hücreleri ve kalp kası hücrelerine farklılaşabilmektedir. Bu nedenle özellikle kök hücre tedavilerinde erişkin kök hücrelerin kullanılması öne çıkmaktadır (Şimşek, 2012)

#### **a) Hematopoetik kök hücreler**

Hematopoetik kök hücrelerin kaynağı, en çok erişkin kök hücrelerinin bulunduğu yer olan kemik iliğidir. Günümüzde bu hücrelerden birçok hastalığın tedavisinde yararlanılmaktadır.

Ancak kemik iliğindeki her 10-15 bin hücreden sadece biri hematopoetik kök hücre olarak kullanılırken, kordon kanında veya plasentadaki bu oran daha fazladır (Prockop, 1997).

(Hematopoetik kök hücrelerin multipotent karakterde olması, kolay elde edilmesi ve hızlı çoğaltılabilmesi gibi avantajları diğer kök hücre türlerine göre daha fazla tercih edilme sebebi olarak gösterilmektedir (Yasuaki ve ark., 2010).

#### **b) Stromal kök hücreler**

Kemik iliği stromal kök hücrelerine mezenkimal kök hücre de denir (Prockop, 1997). Bu hücrelerin kemik, kırıldak gibi birçok dokuya farklılaştığı, karaciğer, sinoviyal sıvı, amniyon sıvısı, plasenta ve periferik kandan izole edilebildiği bildirilmektedir (Şenkal ve ark., 2011).

#### **c) Organlardaki kök hücreler**

Bu hücreler meydana gelen doku hasarı ya da ölümlerinde içinde buldukları dokuyu tamir edebilme yeteneğine sahip, beyin, deri, kas, sindirim sistemi, kornea, retina, pankreas ve karaciğer gibi dokularda bulunan kök hücrelerdir (Şimşek 2012).

#### **2. Fötal kök hücreler**

Gebeliğin istemli ya da istemsiz olarak sonlanmasıyla elde edilen fötal dokudan, multipotent özellikteki kök hücreler ile pluripotent özellik taşıyan embriyonik üreme hücreleri ayrıştırılabilmektedir. Bu nedenle fötal kök hücreler, bilimsel çalışmalarda embriyonik kök hücrelerine alternatif olarak kullanılmaktadır (Meyer, 2000). Bu hücrelerin araştırma ve tedavide kullanımı etik

açından ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Ancak kendiliğinden düşük yapmış kişilerin gönüllü olarak bu hücrelerin kullanımına izin vermesi ile araştırma ve tedavi amacıyla kullanılabilir. Tüm bu nedenlerden dolayı fetal kök hücrelerin tedavilerde kullanımı oldukça sınırlı düzeylerde seyretmektedir (Lisker, 2003).

#### Veteriner Hekimlikte Kök Hücre Kullanımı

Kök hücre çalışmalarının temel noktası, araştırma çalışmalarının sonucunda tedavi aşamalarında kullanımınıdır. Bu tedavi pluripotent veya multipotent kök hücrelerinin hastalıklı ya da hasarlı dokuların yerine kullanılmasını kapsayan bir tedavi şeklidir. Aynı zamanda bu tarz hastalıkların tedavisine gen terapisi de eklenmektedir. Gen terapisinde, meydana gelen hasarda ya da bozuklukta oluşan bozuk genin kopyasının oluşturularak yedeklenmesi amaçlanmaktadır (Kruse ve ark., 2008).

Veteriner hekimlik alanında kök hücre tedavisi ilk olarak Herthel tarafından 1995 yılında atların ligament problemlerinde uygulanmıştır. Bu amaçla sternumdan elde edilen büyük hacimdeki saf kemik iliği doğrudan hasarlı ligament üzerine enjekte edilmiş, gerçekleştirilen uygulama sonrası geleneksel tedavi yöntemlerine kıyasla fonksiyonel iyileşme sağlandığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda da kök hücre tedavilerinin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Herthel, 2002).

Kök hücreler, kedi ve köpeklerde, kalp hastalıklarında, ortopedik lezyonlarda, tip I ve II diyabette, kırık defektlerinde, merkezi sinir sistemi hastalıklarında, göz hastalıklarında ve tümöral olguların tedavisinde kullanılmaktadır. Atlarda tendinitis, ligament, eklem ve kırık defektlerinin tedavisi ile büyükbaş hayvanlarda ortopedik hasarlar, deri lezyonları ve eklem hastalıklarında da kullanılmaktadır (Erol ve Arıcan, 2008).

Atlarda ligament, tendo ve eklem hasarlarında mezenkimal kök hücrelerin kullanımı başarılı sonuçlar vermektedir. Mezenkimal kök hücrelerin vücuttan izole edilmesi üç yöntemle gerçekleştirilmektedir (Schnabel ve ark., 2007). İlk yöntemde kemik iliğinden alınan örnekler çoğaltılarak konsantre kök hücre popülasyonları elde edilmekte, ikinci yöntemde kemik iliğinden alınan örnekler çoğaltılarak konsantre karışık kök hücre popülasyonları meydana getirilmektedir. Son yöntemde ise yağ dokudan elde edilen hücreler çoğaltılarak kök hücre popülasyonları oluşturulmaktadır. Üç yöntem sonucunda mezenkimal kök hücreler elde edilerek tedavide kullanılmaktadır (Schnabel ve ark., 2008).

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, kolay ve nispeten invaziv olmayan bir şekilde elde

edilmekte ve diğer mezenkimal kök hücrelere kıyasla kas iskelet sistemi dokularına farklılaşma kapasitelerinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Kisiday ve ark., 2008). Atlarda kemik iliği ve sternumdan, köpeklerde ise proksimal humerus veya femurdan elde edilmektedir. Alınan kemik iliğinden kök hücre meydana gelmesi için 3-6 haftalık bir sürece ihtiyaç vardır (Vidal ve ark., 2008).

Akut ve kronik tendinitisli, osteoarthritisli ve osteokondrotisli atlarda yapılan kök hücre çalışmaları başarılı sonuçlar vermiş, hastalığın nüks etme oranının düşük ve tedavi başarı yüzdesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Kisiday ve ark., 2008). Deneysel olarak yapılan klinik çalışmalarda, pluripotent veya fetal kök hücrelerin transplantasyonu ile omurilik hasarları, Pürkinje hücre dejenerasyonu, karaciğer ve kalp yetmezliği, kas distrofisi gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde kök hücre tedavilerinin başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Yılmaz ve Uçar, 2006). Aynı şekilde iyileşme belirtisi göstermeyen ya da kırık hatlarının birbirinden uzak olduğu kemik kırıklarında, nonunion, malunion gibi kemik defektlerinde, mezenkimal kök hücrelerin etkili olduğu rapor edilmektedir (Udehiya ve ark., 2013). Dermatolojik hastalıklar açısından iyileşme belirtisi göstermeyen ya da çok yavaş iyileşme gösteren kronik yaraların tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin kullanılmasının yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir (Das ve ark., 2012). Atopik dermatit gibi immun kökenli dermatolojik hastalıklarda, yara dokularında, nedeni belli olmayan alopesilerde mezenkimal kök hücrelerin etkili olduğu gösterilmiştir (Harman, 2013). Göz hastalıklarında, özellikle optik sinir hasarında, göz yanıklarında ve gözün tümöral olgularında, kök hücreler, tedavide başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerin özellikle ulkus kornea gibi göz hastalıklarında etkili olduğu bildirilmektedir (Marfe ve ark., 2012).

#### Sonuç

Sonuç olarak veteriner hekimlik alanında yapılan çalışmalar göstermektedir ki kök hücrelerin veteriner hekimlik alanında kullanımı oldukça önemlidir. Günümüzde maliyetinin yüksek olması çiftlik hayvanlarında kullanımını kısıtlasa da özellikle yarışlarda kullanılan ve maddi değeri yüksek olan atların önemli sorunlardan biri olan ayak hastalıklarında kök hücre tedavilerinin olumlu sonuç verdiği bilinmektedir. Bunun yanında özellikle pet hayvanları ile insanlar arasında duygusal bağların gelişmesi pet hayvancılığının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Birçok hasta sahibi tedavisi mümkün olmayan hastalıklara yakalanmış petleri için farklı

çözüm yolları aramaktadır Kök hücrelerinin bu ve benzeri sebeplerle veteriner hekimlikte kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir. Bundan dolayı kök hücreleri ve bu hücrelerinin veteriner hekimlikte kullanım alanları ile ilgili bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Hazırlanmış olduğumuz bu derlemenin hem serbest veteriner hekimler hem de bu konuda çalışma yapmak isteyen araştırmacılar için ön bilgi kaynağı olacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY, 2013: The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature Medicine*, 19(1), 35-42.
- Clevers H, 2015: What is an adult stem cell? *Science*, 350(6266), 1319-1320.
- Das J, Nath I, Kumardas R, Routray P, Behera SS, 2012: Autologous stem cell therapy to treat chronic ulcer in heifer- A case study. *Vet World*, 5(12), 771-774.
- Erol H, Arıcan M, 2008: Atlarda Tendinitisin Kök Hücre İle Sağaltımı I: Kök Hücre Nedir ve Niçin Önemlidir? Veteriner Hekimliğinde Kullanım Alanları Nedir. *Veteriner Cerrahi Derg*, 14(2), 26-31.
- Gattegno-Ho D, Argyle SA, Argyle DJ, 2012: Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Vet J*, 191, 19-27.
- Harman RJ, 2013: Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Vet Dermatol* 24, 90-124.
- Herthel DJ, 2002: Suspensory desmitis therapies. Proc 12th ACVS Symp., 165-167.
- Juopperi TA, 2012: Back to basics: Stem cells and veterinary medicine. *The Vet J*, 191, 139-140.
- Kalra K and Tomar P.C, 2014: Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *AJPCT*, 2(7), 919-930.
- Karaşahin T, 2012: Review Articles Embriyonik Kök Hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 9(1), 65-71.
- Kisiday JD, Kopesky PV, Evans CH, Grodzinky AJ, Mcwraith CW, Frisbie DD, 2008: Evolution of Adult Equine Bone Marrow-and Adipose-Derived Progenitor Cell Chondrogenesis in Hydrogel Cultures. *J Orthop Res* 26, 322-331.
- Kruse C, Danner D, Rapoport H, 2008: Current Stem Cell Technology: Limitations and Realistic Expectations. *Eng Life Sci*, 8(1), 13-18.
- Lisker R, 2003: Ethical and Legal Issues in Therapeutic Cloning and the Study of Stem Cells. *Arch Med Res*, 34, 607-611.
- Marfe G, Giordano MM, Ranalli M, Cozzoli E, Distefano C, Malafoglia V, Poletti M, Gambacurta A, 2012: Blood Derived Stem Cells: An Ameliorative Therapy in Veterinary Ophthalmology. *J Cell Physiol*, 227, 1250-1256.
- Meyer JR, 2000: Human embryonic stem cells and respect for life. *J Med Ethics*, 26(3), 166-170.
- Perin EC, Geng YJ, Willerson JT, 2003: Adult Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation*, 107, 935-938.
- Prockop DJ, 1997: Marrow Stromal Cells As Stem Cells For Nonhematopoietic Tissues. *Science*, 276(5309), 71-4.
- Sağsöz H, Ketani MA, 2008: Kök Hücreler. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2), 29-33.
- Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA, 2007: Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*, 25, 230-240.
- Schnabel LV, Mohammed HO, Jacobson MS, Fortier LA, 2008: Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Vet*, 40, 260-265.
- Şahin F, Saydam G, Omay SB, 2005: Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *UHOD*, 15(1), 48-56.
- Şenkal İV, Akyüz Ü, Yalınz F, Çiftçi F, Yurtsever A, 2011: Mezenkimal kök hücrelerin ratlarda crohn hastalığı modelinde doku hasarı, enflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinlere etkisi. *İst Tıp Fak Derg*, 74(4), 59-63.
- Şimşek Ö, 2012: Yetişkin Kök Hücrelerin Dünü ve Bugünü. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 7(3), 231-236.
- Thomson JA, Eldor JI, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, 1998: Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.
- Thore CB, Sudheer S, Janke D, Jagodzinska J, Jung M, Adjaye J, 2008: The Origins of Human Embryonic Stem Cells: A Biological Conundrum. *Cells Tissues Organs*, 188, 9-22.
- Udehiya RK, Amarपाल, Aital HP, Kinjaydekar P, Pawde AM, Singh R, Sharma GT, 2013: Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits. *Res Vet Sci*, 94, 743-752.
- Ural AU, 2006: Kök Hücreler. *TOTBİD*, 5, 140-145.
- Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM, 2008: Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg*, 37, 713.
- Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR and Vese G, 2012: The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics – a review. *N Z Vet J*, 60(5), 265-272.
- Yasuaki O, Yasuhide Y, Hiroe O, Mika T, Yoshihiro K, Mari S, Yoko K, Koji H, Shigeru S, Katsuhisa H, Shunsuke Y, Hajime O, 2010: Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*, 285, 29270-29278.
- Yılmaz O, Uçar M, 2006: Kök hücre çalışmaları ve terapötik klonlama. *Hayv Araş Derg*, 16(1), 26-31.

\*Yazışma adresi: Osman BULUT

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Milas Veteriner Fakültesi, Milas, Türkiye.

e-mail: obulut@mu.edu.tr

## Eye Cases Requiring Emergency Intervention in Animals\*

Ünal YAVUZ<sup>a,1\*\*</sup>, Kerem YENER<sup>b,1</sup>, Ali HAYAT<sup>c,1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Eyyübiye Campus, Şanlıurfa, TURKEY  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4981-2355; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-6947-0356; <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-8597-0705.

Geliş Tarihi: 22.01.2020

Kabul Tarihi: 05.06.2020

**Abstract:** Head injuries and accidents that cause lesions in the eye tissue can cause loss of vision, pain and severe deformities. In the emergency clinic, intervention in eye injury cases requires accurate and rapid diagnosis. The main objectives of such interventions are to prevention of loss of vision, prevention of loss of bulbus oculi, reduction of pain, and prevention of long-term complications. Traumatic proptosis (especially brachicephalic dog breeds), traumatic retrobulbar hemorrhage, desemetoccele, iris prolapse and corneal lacerations are more common in dogs, cats and horses when evaluated according to animal species. General condition and regional deformity in clinical examination and loss of vision in systematic eye examination are evaluated. Complications should be prevented by medical intervention or surgery immediately after diagnosis. In conclusion, it is extremely important to prevent the permanent sequelae of the eye in the emergency clinic through a correct diagnosis without delay.

**Keywords:** Emergency; eye; trauma; vision loss

### Hayvanlarda Acil Girişim Gerektiren Göz Olguları

Göz dokusunda lezyon oluşturan kafa travmaları ile kazalar görüş kaybı, ağrı ve şiddetli deformitelere neden olabilir. Acil klinikte göz olgularına girişim doğru ve hızlı teşhis gerektirmektedir. Bu girişimde temel amaçlar; görüş kaybının engellenmesi, bulbus oculi kaybının engellenmesi, ağrının azaltılması ve uzun dönem komplikasyonların engellenmesidir. Hayvan türlerine göre değerlendirildiğinde köpek, kedi ve atlarda travmatik proptosis (özellikle brahisefalik köpek ırkları), travmatik retrobulbar kanama, desemetosel, iris prolapsusu ve korneal yırtıklarla daha sık karşılaşılmaktadır. Klinik muayenede genel durum ve bölgesel deformite, sistematik göz muayenesinde ise görüş kaybı değerlendirilir. Tanı kesinleştirildikten hemen sonra medikal tedavi veya operatif girişimle komplikasyon gelişimi engellenmelidir. Sonuç olarak acil klinikte göz olgularına doğru teşhisle zaman kaybetmeksizin girişimde bulunulması gözdeki kalıcı sekellerin önlenmesi açısından son derece önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Acil; göz; travma; görme kaybı

### Introduction

Accidents such as trauma affecting the eye tissue, chemical burns, penetration of foreign bodies into different depths of the bulbus oculi may cause severe pain and permanent loss of vision, and thus require emergency intervention through accurate and rapid diagnosis (Adamantos and Garosi, 2011; Aiello, 2016; Belknap, 2015; Betbeze, 2015; Giuliano, 2005; Mandell, 2011; Özba and Kılıç, 2004; Ressel et al., 2016; Sansom and Labruyère, 2012; Tetas et al., 2016). Eye anatomy should be well known in emergency interventions (Figure 1). The main objectives of such interventions are a) prevention of loss of vision, b) prevention of loss of bulbus oculi, c) reduction of pain, d) prevention of long-term complications (Aiello, 2016; Mandell, 2011; Özba and Kılıç, 2004). As there are also head traumas in most of the cases, it may be necessary to start treatment of such lesions before starting eye eye treatment (Mandell, 2011; Ressel et al., 2016). Clinical examinations start with checking whether there is discharge in the eyes, blepharospasm,

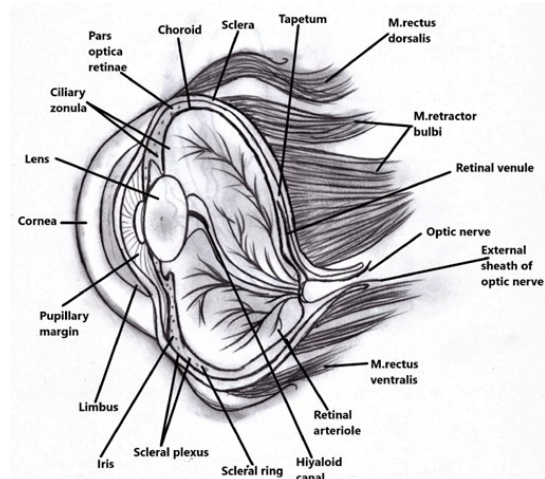


Figure 1. The ocular anatomy of the dog eye (drawing).

photophobia, strabismus, third eyelid protrusion, and changes in the bulbus oculi in the temporal or medial direction. The orbita is examined for rim fractures; bulbus oculi for its position within the



orbita and exophthalmus; periorbital structures for swelling, bleeding, discoloration, scratches, and injuries; the conjunctiva for bleeding and tears; the sclera and cornea for integrity, opacity, ulcers, foreign bodies, injuries and tears; and the anterior chamber is examined for anterior uveitis and hyphema (Betbeze, 2015; Giuliano, 2005; Mandell, 2011; Tetas et al, 2016).

Systematic eye examinations should be initiated by examining the loss of vision. The size of the pupil and pupillary light reflex are determined by using a light source. The opacity of the ocular layer and the size and symmetry of the pupil are examined directly by using an ophthalmoscope. By setting it to +20 diopters, the eyelids, bulbar and palpebral conjunctiva are checked. When examining the conjunctiva, the surface of the nictitating membrane is also checked. Again, the transparency and structural integrity of the cornea is assessed by setting it to +20 diopters; the color and shape of the uvea is assessed by adjusting it to +10 diopters; the transparency, position and stability of the lens are assessed by setting it to  $+10 \pm 5$  diopters; and the position, tapetal reflection and vascular system of the corpus vitreous and the retina are assessed by setting it to  $0 \pm 3$  diopters. In the emergency eye clinic, each animal should undergo Schirmer's tear test I and intraocular pressure measurement with a tonometer (Barrie and Williams, 2002a). If the lens, corpus vitreous, retina and sclera cannot fully be assessed, the assessment can be performed with B-mode ultrasonography by using a 7.5–12 MHz probe (Betbeze, 2015; Mandell, 2011; Sansom and Labruyère, 2012).

Eyelid injuries, traumatic proptosis, traumatic retrobulbar hemorrhage, foreign body pricking into the cornea and deep tissues, deep corneal ulcers, descemetocele, iris prolapse, corneal tears, acute glaucoma, anterior lens luxations, traumatic anterior uveitis, optic neuritis, retinal detachment, hyphema, chemical burns are the most common cases in emergency eye clinics (Aiello, 2016; Betbeze, 2015; Giuliano, 2005; Mandell, 2011; Özba and Kılıç, 2004; Wilkie, 2003).

#### Eyelid Injuries

Such injuries are usually caused by the effect of vehicle traumas bites or cutting tools (Figure 2A). The time elapsed after injury, the prevalence of bacterial contamination, the extent of injury to the puncta lacrimalis and ductus nasolacrimalis, and the degree of tissue loss should be taken into consideration during the assessment in terms of prognosis. As the irritation of the eyelid will lead to damage to the cornea, intervention should be made as quickly as possible. The treatment begins with the cleansing of the area and irrigation of the area by using physiological saline solution or Ringer's

lactate solution. The antisepsis of the skin is ensured by using 1% povidone iodine solution, an attempt is made to prevent wound contamination by using antibiotic eye drops (Mandell, 2011; Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2013; Wilkie, 2003). Eyelid injuries with loss of material caused by trauma or iatrogenesis cause ulceration and fibrosis with severe and chronic corneal irritations in the long term. Therefore, it should be avoided to remove tissue from irregular wounds on the eyelid boundary. If more than 1/4 of the eyelid tissue has material losses, it is necessary to use blepharoplasty techniques to protect the normal eyelid anatomy (Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2013; Wilkie, 2003).

In full-level injuries, the skin should be sutured after the conjunctival layer (Figure 2B). The conjunctival layer is sutured with 5/0–7/0 absorbable sutures (PGA, PGLA); the skin is sutured with 4/0–5/0 absorbable sutures (PGA, PGLA) or silk and nylon sutures in the form of simple separate sutures. Attention should be paid to bury the knots in the subconjunctival area at the conjunctival layer, and to leave the ends of the knots at a length preventing them to touch the cornea (Figure 2C). While the eyelid edges are aligned to be parallel to each other, attention should be paid to make the edge contours proper and reciprocal (Figure 2D) (Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2013).

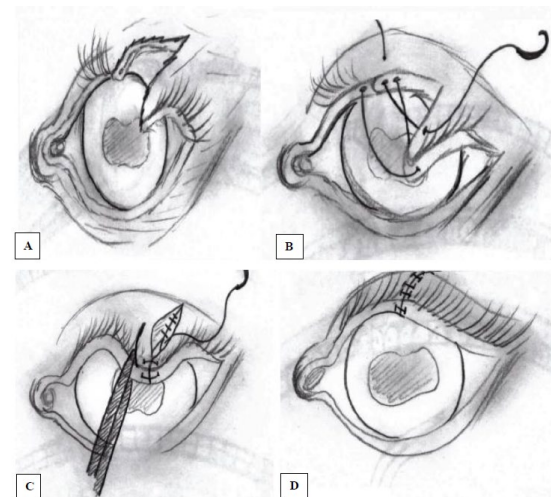


Figure 2. The suture application in the eyelid injury (drawing). A. Upper eyelid injury. B. A figure-eight suture at the conjunctival layer. C. The ends of the knots should be left at a length that prevents them to touch the cornea. D. The eyelid edge contours should be proper and reciprocal.

There is no need for local antibiotic use when using broad-spectrum systemic antibiotics such as amoxicillin/clavulanic acid in the postoperative period (Mandell, 2011).

#### Traumatic Proptosis

This is the case in which the bulbus oculi is located outside the eyelids and orbita at varying degrees (Figure 3). Its etiology is always traumatic,

but the brachycephalic dog breeds are more prone to it (Betbeze, 2015; Gilger et al, 1995; Özba and Kılıç, 2004; Ressel et al, 2016; Şaroğlu, 2013; Wilkie, 2003).

The prognosis depends on the size and reflexes of the pupil, the duration of exposure to trauma, the extent of damage to the bulbus oculi and the orbita, and the trauma that the body is exposed to. After the correct treatment, approximately 40 to 60% of dogs gain the ability to see again, while few cats continue to have eyesight (Aiello, 2016; Ressel et al, 2016). In the treatment, corneconjunctival tissue is moistened primarily by using artificial tears, contact lens solution, lactated ringer or normal saline (Aiello, 2016; Özba and Kılıç, 2004; Wilkie, 2003). Before the bulbus oculi is placed in the orbita, in order to facilitate the process and to prevent pressure in intraocular tissues, the lateral canthotomy procedure is performed after the animal is subjected to general anesthesia (Aiello, 2016; Betbeze, 2015; Gilger et al, 1995; Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2016; Wilkie, 2003). After the placement of the bulbus oculi in the orbita, tarsorrhaphy or blepharorrhaphy is performed. The eyelid edges are sutured with 2–3 horizontal U-shaped stitches. Sponge pieces can be used as stents in order to prevent from ischemic necrosis. Local and systemic antibiotics with retrobulbar injections of methylprednisolone or triamcinolone should be used for 5–7 days. After intraorbital swelling is gone (7–21 days), the sutures are removed (Aiello, 2016; Şaroğlu, 2013). Corneal ulceration, enophthalmus, optic nerve atrophy, keratoconjunctivitis sicca and musculus rectus medialis injuries are the most common complications (Aiello, 2016; Betbeze, 2015; Özba and Kılıç, 2004).

#### Traumatic Retrobulbar Hemorrhage

Traumas that hit the orbita and bulbus oculi create a retrobulbar hemorrhage by damaging the orbital veins and cause exophthalmos, iridocyclitis and lagophthalmos. The hemorrhage is seen mostly in dogs, horses and cats. Due to the exophthalmos and lagophthalmos, the blinking reflex is affected and accompanied by acute ulcerative keratitis. Subconjunctival and intraocular bleeding can also accompany, and intraocular bleeding prevents detailed eye examination. In this case, examination should be performed by using a B-mode USG to detect retinal detachment (Aiello, 2016; Betbeze, 2015; Louhgran et al, 2016; Ressel et al., 2016).

In the treatment, topical and systemic antibiotics, corticosteroids, mydriatics, when necessary, to dilate the pupil, and temporary tarsorrhaphy are administered to protect the cornea until the blink reflex recurs. Although the prognosis is suspected due to secondary glaucoma

and phthisis bulbi complications, bleeding is often absorbed in the case of intraocular bleeding (Aiello, 2016).

#### Foreign Bodies Pricking into the Cornea and Deep Tissues

Although it varies according to the size, length and sharpness of the foreign body (Figure 3), clinical findings (pain, blepharospasm, lacrimation, varying degrees of secondary iridocyclitis, and so forth) are similar in most cases (Barnett, 2006; Belknap, 2015; Crispin, 2005; Labelle et al, 2014; Tetas et al., 2016).

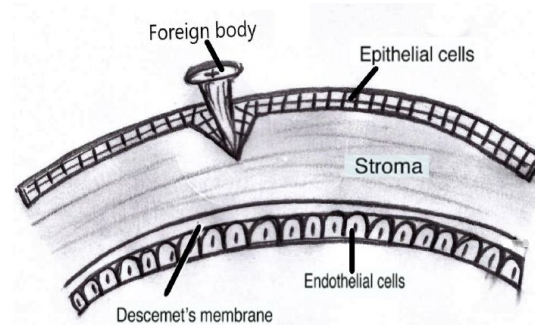


Figure 3. Foreign body pricking into the cornea (drawing).

Foreign bodies pricking into the cornea and corneal injuries should be removed immediately, as they can become a complicated case, causing corneal stromal abscess. The facial foreign bodies in the cornea can be removed with foreign body forceps a few minutes after the application of topical local anesthetic (proxymetacaine hydrochloride 0.5%) (Figure 4).

Plain foreign bodies, such as thorns and metal chips, are difficult to remove when they penetrate into deep tissues from the cornea and require general anesthesia. Foreign bodies penetrating into deep tissues are removed by slowly and carefully pulling in the same direction as the input angle using a 25–30-gauge needle or foreign body needle. The use of tissue forceps may cause foreign bodies to penetrate deeper (Belknap, 2015; Crispin, 2005; Cullen and Grahn, 2005).

#### Chemical Burns

Chemical burns are not common in eye cases of animals requiring urgent intervention. Chemical burns may occur in eyes due to exposure to alkaline chemicals such as ammonium hydroxide, sodium hydroxide, calcium hydroxide, potassium hydroxide and magnesium hydroxide, and acidic chemicals such as sulfuric acid, acetic acid and hydrochloric acid (Belknap, 2015; Barrie and Williams, 2002b; Dohlman et al, 2011; Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2013).

The chemicals that cause the most severe ocular damage are the ones with alkaline properties, and burns caused by ammonium hydroxide found in ammonia-based fertilizers,

detergents and refrigerants are the most common chemical burns (Barrie and Williams, 2002b; Şaroğlu, 2013). The most important factor among alkaline and acidic chemicals affecting the depth and severity of lesions is the coagulation mechanism of proteins in the epithelial layer. Because the high pH of alkaline chemicals does not denature surface proteins, it does not cause a coagulative change. Thus, it penetrates deeper and causes more destruction of epithelial layer and stroma, and deep burns. Because it rapidly destroys all the cells that it is in contact with, including the stem cells of the corneal epithelium, it leads to chronic ulcers that do not heal. In chemical burns caused by acids, coagulation that is formed prevents the chemical agent from penetrating deeper, and the depth of burns remains limited (Barrie and Williams, 2002b; Belknap, 2015; Özba and Kılıç, 2004).

The first 1–3-minute intervention after an accident is crucial. It should not be attempted to go for neutralization with acids in alkaline burns and neutralization with alkalines in acid burns. In this case, the resulting heat after the reaction can cause more damage to the eye (Şaroğlu, 2013). Normal saline is the most suitable solution for washing the eye, but chemical factors in the corneal or conjunctival sac are also removed by using plenty of water or lactated ringer. Washing should be maintained for at least 30 minutes (Belknap, 2015; Özba and Kılıç, 2004; Şaroğlu, 2013; Dohlman et al., 2011). Epithelial rashes can be removed using a cotton swab, but topical anesthesia should be applied before that (Özba and Kılıç, 2004). Topical broad-spectrum fluoroquinolone-type antibiotics (ofloxacin 0.3%), and oral doxycycline are used (Barrie and Williams, 2002b; Belknap, 2015). To ensure the regeneration of epithelial tissue, artificial tear, soft contact lens, epidermal growth factor, sodium hyaluronate and fibronectin applications are being tested. The use of corticosteroids in the acute period of chemical burns is not appropriate. Their use in this period may cause the inhibition of fibroblast and collagen synthesis through keratocyte migration. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) should be used instead of corticosteroids to control inflammation (Gelatt, 2012; Şaroğlu, 2013).

#### **Deep Corneal Ulcers, Descemetocele, Iris Prolapse**

They develop mostly in the center of the cornea and can severely affect the vision (Figure 4). It is more common in dogs, cats and horses. Dogs with keratoconjunctivitis sicca and brachycephalic breeds are more prone to it. Schirmer's tear test and fluorescein test should be used in diagnosis, and the anterior segment should be examined in

detail. Secondary anterior uveitis, ocular hypotonia and hypopyon are common findings. Central corneal ulcers require more time for recovery and vascularization (Aiello, 2016; Gelatt, 2012; Wilkie, 2003).

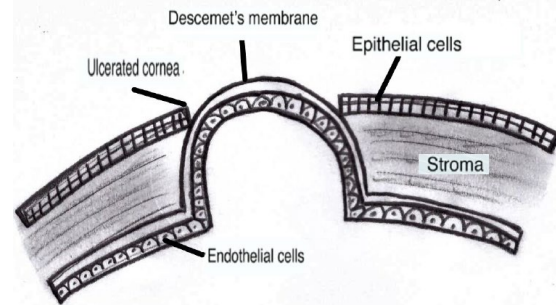


Figure 4. Descemetocele (drawing).

In the medical treatment of uncomplicated corneal ulcers, ofloxacin or the ternary combination of neomycin, polymyxin and gramicidin can be administered at intervals ranging from 2 hours to 6 hours per day depending on the severity of ulceration. In the treatment of deep and severe ulcers, the topical use of ciprofloxacin 0.3% is beneficial. As a mydriatic-cycloplegic agent, atropine 1% topical application should be used without exceeding a 6-hour interval. The use of artificial tears for moisturizing the corneal surface also supports the treatment (Kim et al., 2009; Wilkie, 2003).

In cases where there is no response to medical treatment, the stromal depth is deeper than 50% or if there is a risk of corneal perforation, operative treatment should be performed. Operative procedure is performed using lamellar (with partial thickness) or penetrating (full-thickness) keratoplasty techniques with conjunctival grafts. Conjunctival autografts can originate from bulbar and palpebral conjunctiva. Deep corneal ulcer, descemetocele or iris prolapse is coated with bulbar conjunctival grafts in the style of 180°, 360°, bridge or pedicle (Aiello, 2016; Belknap, 2015; Hansen and Guandalini, 1999; Kim et al, 2009; Wilkie, 2003). While the lamellar keratoplasty technique is used in the treatment of deep corneal ulcers with high risk of perforation, the penetrating keratoplasty technique is used when a full-thickness keratectomy is needed in the case of descemetocele tears or to excise an unrecoverable cornea which has become infected, degenerated or infiltrated during the operation (Wilkie, 2003).

#### **Corneal Tears**

It is most common in horses and dogs and is less common in cats (Figure 5). Bites, traumas caused by the animal itself, and other accidents can



tear the cornea partially or deeply. Partial corneal tears show only pain, while deep corneal tears show signs of pain, blepharospasm, corneal defect and varying levels of iris prolapse. In deep tears (Figure 5), hyphema, miosis and distorted pupil may exist together and the size of the prolapsed iris is larger than that of the corneal tear (Aiello, 2016; Ressel et al., 2016). The prognosis depends on the position and size of the corneal tear, the exposure of close ocular tissues, gender (horses), the age of the animal, the elapsed time and other systemic injuries. B-mode USG should be used if the clinical examination cannot fully be performed (Aiello, 2016; Belknap, 2015; Tetas et al, 2016).

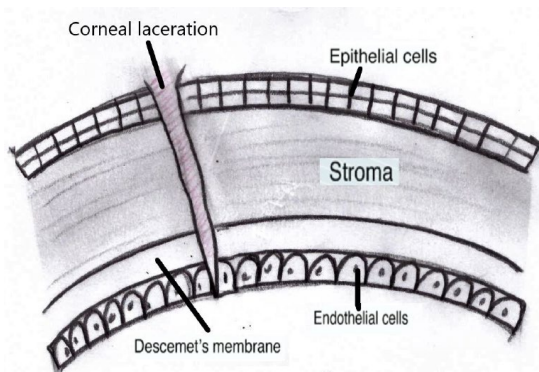


Figure 5. Deep laceration in the cornea (drawing).

Corneal tears are treated with simple separate sutures using the 7/0, 8/0, 9/0 absorbable sutures by matching the healthy tissues and suturing them. In partial tears, the torn part should be sutured without removal. To support and protect, the sutured area is protected by a third eyelid flap, bulbar conjunctival graft or temporary tarsorrhaphy. To control secondary iridocyclitis, topical and systemic antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and mydriatics are used in the postoperative period. Corneal wound scar, cataract with posterior synechia, secondary glaucoma, phthisis bulbi and bacterial endophthalmitis are complications seen after operation (Aiello, 2016; Belknap, 2015; Braus et al., 2017).

#### Acute Glaucoma

Glaucoma is an increase in intraocular pressure as a result of the obstruction of the flow of aqueous humor. It damages retinal ganglion cells and axons, as well as loss of irreversible vision. It is divided into two as primary and secondary. Primary glaucoma is shaped based on the reduction in the flow of aqueous humor due to the abnormality of iridocorneal angle trabecular network, whereas secondary glaucoma is caused by a pre-existing reason in the bulbus oculi (Curto et al, 2014; Wilkie, 2003; Wilkie, 2010). The situation in which intraocular pressure (IOP) in animals reaches 40–60

mmHg is considered glaucoma. It shows clinical findings in the form of buphthalmia, mydriasis, corneal edema, episcleral venous congestion and varying degrees of pain and may result in blindness if no attempt is made in the first few hours (Aiello, 2016; Barrie and Williams, 2002c; Curto et al, 2014; Maggio, 2015). In dogs, German shepherd dog, miniature poodle, American cocker spaniel, beagle, Siberian wolf, malamute, Dalmatian, chow chow, chihuahua, and Shar-Pei breeds are more susceptible to primary glaucoma (Aiello, 2016; Barrie and Williams, 2002c; Maggio, 2015; Wilkie, 2003). Glaucoma in cats is often accompanied by anterior uveitis, whereas there is more predisposition to glaucoma in Appaloosa-breed horses and those over 10 years of age. Although it can be detected in buphthalmia dogs in the early period, it may be missed during the period until glaucoma is detected in cats and horses. Diagnosis is made by considering clinical findings and measuring the IOP with Tono-Pen® or TonoVet® applanation tonometers (Aiello, 2016; Curto et al, 2014; Maggio, 2015; Spiessen et al, 2015; Wilkie, 2016). Prognosis in acute primary glaucoma is appropriate but requires lifelong treatment and follow-up (Curto et al., 2014; Wilkie, 2003). The aim of the treatment is to quickly reduce the IOP and prevent loss of sight. The first intervention in medical treatment involves the administration of mannitol (1–2 g/kg, IV), topical  $\beta$ -blockers, carbonic anhydrase inhibitors, systemic carbonic anhydrase inhibitors and prostaglandin analogues or miotic (pilocarpine, demecarium) agents (Aiello, 2016; Crispin, 2005). The benefit of topical applications is often not seen until the IOP drops below 30 mmHg. If the mannitol treatment does not drop the IOP within 2–4 hours, it may be necessary to go for the anterior chamber paracentesis under general anesthesia. In the operative treatment, laser cyclophotocoagulation, cyclocryotherapy and anterior chamber bypass formation methods are used, and the treatment should be initiated in the early period (Aiello, 2016; Maggio, 2015; Wilkie, 2003; Wilkie, 2010). The long-term treatment of glaucoma is continued with topical and systemic ocular hypotensive applications (Aiello, 2016).

#### Anterior Lens Luxations

Trauma occurs as a sequela of anterior uveitis, chronic glaucoma, chronic cataract and intraocular tumors (Braus et al, 2017; Wilkie, 2003). It is most common among middle-aged dogs, especially in Terrier breeds, and is rarely seen in horses (Aiello, 2016; Barrie and Williams, 2002d; Colitz and O'Connell, 2015; Fife et al, 2006; Gialletti et al, 2018; Wilkie, 2003). Acute primary anterior lens luxations show clinical findings in the form of pain, superficial anterior chamber, widespread corneal

edema, iridodonesis and the lens that appear as half-moon after it shifts from the axial plane (Crispin, 2005; Braus et al., 2017; Wilkie, 2003). In the affected eye, the pupillary light reflex is checked, intraocular pressure (IOP) is measured, and fundus is examined. Loss of pupillary light reflex gives a negative indication about prognosis (Wilkie, 2003). The lens is often located in front of the pupil and entirely in the anterior chamber. The medical treatment is mostly initiated by lowering the IOP to normal level using 1–2 g/kg IV of mannitol. After moderate dilatation is provided, phenylephrine 10% is used to regenerate the transpupillary flow of aqueous humor (Aiello, 2016). The lens is removed through phacoemulsification or intracapsular extraction in operative treatment (Aiello, 2016; Braus et al., 2017; Fife et al., 2006). In the postoperative period, corticosteroids are used with topical and systemic antibiotics. IOP is closely monitored and reduced to normal value using topical  $\beta$ -blockers, carbonic anhydrase inhibitors, systemic carbonic anhydrase inhibitors and prostaglandin analogues in case of elevation. Postoperative complications such as ocular hypertension, anterior uveitis, secondary glaucoma, synechia, retinal detachment and hyphema may be seen in the long term (Aiello, 2016; Braus et al., 2017; Fife et al., 2006; Wilkie, 2003).

#### Traumatic Anterior Uveitis

Anterior uveitis, also called iridocyclitis or red eye, is common among dogs, cats and horses but is rare in other animal species. It can be confused with other inflammatory diseases of the cornea and conjunctiva. Clinically, changes in lens such as acute photophobia, pain, blepharospasm, episcleral and conjunctival hyperemia, corneal edema and posterior synechia, as well as decreased IOP and miosis are seen. Moreover, aqueous flashing, hypopyon or hyphema can be seen depending on the increase in the aqueous humor proteins and inflammatory cells (Aiello, 2016; Giuliana, 2005; Renwick and Petersen-Jones, 2009; Volk et al., 2018). In addition to trauma, immune-related diseases such as systemic diseases (especially when affected bilaterally), cataract, primary or metastatic tumors, uveodermatologic syndrome can be involved in the etiology (Aiello, 2016; Renwick and Petersen-Jones, 2009; Tetas et al., 2016). Although the prognosis of acute anterior uveitis is favorable, the prognosis of anterior uveitis arising from immune-related diseases such as the uveodermatologic syndrome is doubtful. In the treatment, mydriatic cycloplegics (atropine 1% and phenylephrine 10%), topical and systemic antibiotics, corticosteroids (prednisolone acetate, dexamethasone) or Nonsteroidal anti-inflammatory

drugs are used (Aiello, 2016; Renwick and Petersen-Jones, 2009; Volk et al., 2018).

#### Hyphema

It is the accumulation of blood in the anterior chamber of the eye (Figure 6). Blood can come from iris, ciliary body, choroid or retina (Mandell, 2011; Özba and Kılıç, 2004; Telle and Betbeze, 2015; Wilkie, 2003). It can be caused by systemic causes, as well as originating primarily from blunt and perforation traumas to the eye (Colitz and O'Connell., 2015; Jins et al., 2018; Şaroğlu, 2013; Telle and Betbeze, 2015; Turner, 2008; Wilkie, 2003). Therefore, the patient should be examined in terms of bleeding in other organ systems (Wilkie, 2003). In the clinical examination, the blood accumulation that varies from bright red to black in the anterior cavity of the eye attracts attention (Şaroğlu, 2013; Turner, 2008). During the diagnosis, the fundus should be examined in terms of retinal hemorrhage and detachment, and IOP should be measured to check for secondary glaucoma, which is commonly encountered as a sequela. If the IOP is low, atropine 1% should be started twice a day and should be monitored at frequent intervals to prevent the synechia (Jinks et al., 2018; Mandell, 2011; Telle and Betbeze, 2015). To assess the position of the lens, retina and posterior wall and other intraocular structures, 10–15 MHz ophthalmic USG should be used in 3–4 cm focal range (Telle and Betbeze, 2015; Wilkie, 2003).

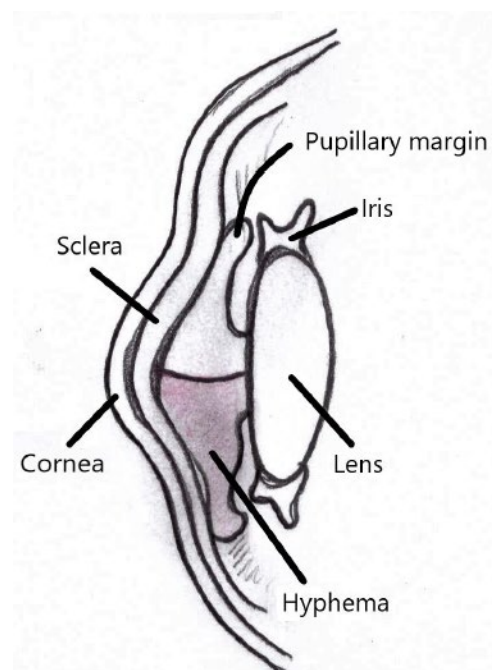


Figure 6. Blood accumulation in the anterior chamber (drawing).

Mild to moderate cases of hyphema caused by trauma are mostly accompanied by anterior uveitis and dissolve in a range of 1–3 weeks if no damage is

observed in other intraocular tissues. If damage has occurred in other intraocular tissues, sequelae such as cataract, posterior synechia, glaucoma, retinal detachment and blindness may be observed (Jinks et al, 2018; Mandell, 2011; Turner, 2008; Wilkie, 2003).

In mild and moderate hyphema cases, dexamethasone 1% or prednisolone acetate 1% is used every 6–8 hours to reduce the inflammation. If the IOP is low or normal, atropine 1% is applied to expand the pupil, and pilocarpine 2% is administered to facilitate fibrinolysis and aqueous drainage by expanding the iris surface. The animal should be rested in case of re-bleeding (Özba and Kılıç, 2004; Telle and Betbeze, 2015; Wilkie, 2003).

If a large blood clot is formed that may cause secondary glaucoma, 25-50 µg tissue plasminogen activator (TPA) can be injected into the anterior chamber to achieve thrombolysis. Dipivefrine 0.1%, a sympathomimetic agent, can be used twice a day, if the IOP is high and the pupil has narrowed. In order to control the IOP, topical applications such as dorzolamide and timolol should also be started, and the eye should be examined at intervals of 24–48 hours (Mandell, 2011; Telle and Betbeze, 2015; Wilkie, 2003).

## Conclusion

Eyelid injuries, traumatic proptosis, traumatic retrobulbar hemorrhage, foreign body pricking into the cornea and deep tissues, deep corneal ulcers, descemetocoele, iris prolapse, corneal tears, acute glaucoma, anterior lens luxations, traumatic anterior uveitis, hyphema, and chemical burns are the most common cases in emergency eye clinics. As the delay in the intervention of eye cases in the emergency clinic will cause loss of vision, pain and significant complications, medical treatment or surgery intervention should be made immediately after diagnosis.

## References

- Adamantos S, Garosi L, 2011: Head trauma in the cat. 1. Assessment and management of craniofacial injury. *J Feline Med Surg*, 13(11), 806-814.
- Aiello SE, 2016: Ophthalmic emergencies. In "Emergency medicine and critical care", 11th ed., p.1696-1701.
- Barnett K, 2006: Cornea trauma and foreign bodies. In "Diagnostic Atlas of Veterinary Ophthalmology". 2nd ed., London, Mosby Elsevier, UK.
- Barrie K, Williams D, 2002a: Diagnostic principles and techniques (Chapter 1). In "Handbook of Veterinary Ocular Emergencies", Ed; Evans TF, 1st ed., Cornwall, Butterworth-Heinemann, USA.
- Barrie K, Williams D, 2002b: Cornea. In "Handbook of Veterinary Ocular Emergencies", Ed; Evans TF, 1st ed., Cornwall, Butterworth-Heinemann, USA.
- Barrie K, Williams D, 2002c: Glaucoma. In "Handbook of Veterinary Ocular Emergencies", Ed; Evans TF, 1st ed., Cornwall, Butterworth-Heinemann, USA.
- Barrie K, Williams D, 2002d: Lens. In "Handbook of Veterinary Ocular Emergencies", Ed; Evans TF, 1st ed., Cornwall, Butterworth-Heinemann, USA.
- Belknap EB, 2015: Corneal emergencies. *Topics in Companion an Med*, 30, 74–80.
- Betbeze C, 2015: Management of orbital diseases. *Topics in Companion an Med*, 30, 107–117.
- Braus BK, Tichy A, Featherstone HJ, et al, 2017: Outcome of phacoemulsification following corneal and lens laceration in cats and dogs (2000-2010). *Vet. Ophthalmol*, 20(1), 4-10.
- Colitz MHC, O'Connell K, 2015: Lens-related emergencies: Not always so clear. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(3):81–85.
- Crispin SM, 2005: Notes on Veterinary Ophthalmology. 1st Ed., Oxford: Blackwell Science Ltd, UK.
- Cullen CL, Grahn BH, 2005: Diagnostic ophthalmology, right corneal foreign body, secondary ulcerative keratitis, and anterior uveitis. *Can Vet J*, 46(11), 1054-55.
- Curto EM, Gemensky-Metzler AJ, Chandler HL, Wilkie DA, 2014: Equine glaucoma: a histopathologic retrospective study (1999–2012). *Vet. Ophthalmol*, 17(5), 334–342.
- Dohlman CH, Cade F, Pfister R, 2011: Chemical burns to the eye: Paradigm shifts in treatment. In "Cornea", 30(6), 613-14.
- Fife TM, Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA, 2006: Clinical features and outcomes of phacoemulsification in 39 horses: a retrospective study (1993–2003). *Vet. Ophthalmol*, 9(5), 361–68.
- Gelatt KN, 2012: Köpeklerde kornea ve sklera hastalıkları operasyonları. In "Temel Veteriner Oftalmoloji", Ed; Sirri A, 1. Baskı, Medipress, Malatya.
- Gialletti R, Marchegiani A, Valeriani T, et al, 2018: A survey of ocular ultrasound abnormalities in horse: 145 cases. *J Ultrasound*, 21(1), 53-59.
- Gilger BC, Hamilton HL, Wilkie DA, et al, 1995: Traumatic ocular proptoses in dogs and cats: 84 cases (1980-1993). *J Am Vet Med Assoc*, 206(8), 1186-1190.
- Giuliano EA, 2005: Feline ocular emergencies. *Clinical techniques in small animal practice*, 20(2), 135-141.
- Hansen PA, Guandalini A, 1999: A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Vet. Ophthalmol*, 2(4), 233-241.
- Jinks MR, Olea-Popelka F, Freeman KS, 2018: Causes and outcomes of dogs presenting with hyphema to a referral hospital in Colorado: A retrospective analysis of 99 cases. *Vet. Ophthalmol*, 21(2), 160-166.
- Kim JY, Won HJ, Jeong SW, 2009: A retrospective study of ulcerative keratitis in 32 dogs. *Intern J Appl Res Vet Med*, 7(1), 27-31.
- Labelle AL, Psutka K, Collins SP, Hamor RE, 2014: Use of hydropulsion for the treatment of superficial corneal foreign bodies: 15 cases (1999-2013). *J Am Vet Med Assoc*, 244(4), 476-79.

- Loughran CM, Rasis AL, Haitjema G, Chester Z, 2016: Unilateral retrobulbar hematoma following maxillary nerve block in a dog. *J Vet Emerg Crit Care*, 26(6), 815-18.
- Maggio F, 2015: Glaucomas. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(3), 86-96.
- Mandell DC, 2011: Trauma-associated ocular injury. In "Manual of Trauma Management in the Dog and Cat", Eds; Drobatz KJ, Beal MW, Syring RS, 1<sup>st</sup> ed., West Sussex: John Wiley Sons, UK.
- Özba B, Kılıç E, 2004: Acil göz kliniği. In "Veteriner Acil Klinik", Ed; Özyayın İ, 1. Baskı, Bahçivanlar Basım, Ankara.
- Renwick PW, Petersen-Jones SM, 2009: Orbital and ocular pain. In "Small Animal Ophthalmology". Eds. Peiffer RL, Petersen-Jone SM, 4th ed., London, Saunders Elsevier, UK.
- Ressel L, Hetzel U, Ricci E, 2016: Blunt force trauma in veterinary forensic pathology. *Vet. Pathol*, 53(5), 941-61.
- Sansom J, Labrüyère J, 2012: Penetrating ocular gunshot injury in a Labrador Retriever. *Vet. Ophthalmol*, 15(2), 15-22.
- Spiessen L, Karck J, Rohn K, Meyer-Lindenberg A, 2015: Clinical comparison of the TonoVet rebound tonometer and the Tono-Pen Vet applanation tonometer in dogs and cats with ocular disease: glaucoma or corneal pathology. *Vet. Ophthalmol*, 18(1), 20-27.
- Şaroğlu M, 2013: Kedi ve Köpek Göz Hastalıkları. In "Veteriner Oftalmoloji", 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul,
- Telle MR, Betbeze C, 2015: Hyphema: Considerations in the small animal patient. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(3):97-106.
- Tetas PR, Matas RM, Newton R, Donaldson D, 2016: Corneal and anterior segment foreign body trauma in dogs: a review of 218 cases. *Vet. Ophthalmol*, 19(5), 386-97.
- Turner SM, 2008: Saunders Solutions in Veterinary Practice. Small Animal Ophthalmology, 1st ed., Edinburgh, Saunders Elsevier, UK.
- Volk HA, Bayley KD, Fiani N, Billson FM, 2018: Ophthalmic complications following ocular penetration during routine dentistry in 13 cats. *NZ Vet J*, 9, 1-16.
- Wilkie DA, 2003: Ophthalmic Emergencies. In "Textbook of Small Animal Surgery", Ed: Slatter D 2nd ed., Philadelphia, Elsevier Science, USA
- Wilkie DA, 2010: Equine glaucoma: State of the art. *J Equine Vet*. 42(S37), 62-68.

\*This review was presented as an oral presentation at the 'International 3<sup>rd</sup> Animal Rescue Conference' held on 07.07.2018 in Afyon.

\*\*Corresponding author: Ünal Yavuz

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Eyyübiye Campus, Şanlıurfa, TURKEY  
e-mail:unalyavuz@harran.edu.tr



## HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI \*

**1-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Harran Üniv Vet Fak Derg), özellikle Veteriner Hekimliği bilim alanı ile ilgili olmak üzere insan ve hayvan sağlığını kapsayan Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanmış orijinal klinik ve deneysel araştırmalar, olgu sunumları, derlemeler (çağrılı veya sorumlu yazara ait derleme konusu ile ilgili en az 3 araştırma makalesinin referans listesinde olması gereklidir), kısa bilimsel makale ve editöre mektuplar yayınlayan hakemli bir dergidir. Dergide İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir. Dergi 6 ayda bir, yılda 2 sayı olarak yayınlanır. Yayınlanan makalelerden ücret alınmamaktadır.

**2-** Dergiye kabul edilen yayınlar başka bir yerde yayınlanmamış olmalıdır. Eş zamanlı olarak incelenmek üzere başka dergilere gönderilmiş olmamalıdır. Yayınlanan makalelerden doğacak her türlü hukuki ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. Yazarlara yayın hakkı bedeli ödenmez. Gönderilen makaleler ve ekleri makale yayınlansın veya yayınlanmasın geri iade edilmez.

**3-** Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir. Bununla birlikte yayın, tezden üretilmiş ise ve destekleyen kuruluş var ise yayında belirtilmelidir.

**4-** Dergi Editörlüğüne ulaşan makale, dergi editörlüğünce ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

**5-** Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör, üçüncü bir hakemin veya danışma kurulunun görüşünü alarak karar verir.

**6-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, etik ilkelere saygı çerçevesinde, TÜBİTAK ULAKBİM tarafından Türkiye'de tüm üniversitelerin kullanımına açmış olduğu "ithenticate" intihal tespit programı aracılığıyla gönderilen tüm makale, olgu sunumu ve derlemelerin ön değerlendirmesinin yapılması ve sonuçların gönderilmesi gerekmektedir. Bu ön değerlendirme sonuçlarına göre, makale, olgu sunumu veya derlemelerin başka kaynaklarla benzerlik oranının %15'i (özet, abstract ve kaynaklar hariç) aşmaması gerekmektedir. "ithenticate" programı aracılığı ile yapılacak öndeğerlendirmede benzerlik oranının %15 değerini aşması durumunda yayımlanmak üzere dergimize gönderilen makale, olgu sunumu veya derlemeler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

**7-** Gönderilen herhangi bir makalenin (tüm makale kategorileri için) referanslarının en az % 20'sinin son beş yılda yayınlanan referansları içermesi gerekir. Anonim kaynaklar asgari düzeyde tutulmalıdır.

**8-** Makale yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan Telif Hakkı Devir Sözleşmesinin tüm yazarlar tarafından imzalanarak basımdan önce elektronik olarak dergi editörlüğüne gönderilmesi gerekmektedir. Telif Hakkı Devir Sözleşmesi gönderilmeyen makaleler yayımlamaya kabul edilmiş olsalar bile basılmazlar.

**9-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar, <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd> adresinden gönderildiğinde değerlendirme sürecine alınmaktadır.

**10-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar MS Word formatında, tüm fotoğraflar (resimler) en az 300 dpi çözünürlükte, TIFF veya JPEG formatında kaydedilmiş olmalıdır.

## YAZIM KURALLARI

Yazılar, MS Word formatında, Times New Roman yazı tipinde, 12 punto, çift satır aralıklı ve her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak hazırlanmalıdır. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) eklenmelidir. Bu şekildeki yazılar, şekil ve tablolar dâhil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalar ve derlemelerde 15, kısa bilimsel makale ve olgu sunumlarında 5 sayfayı geçmemelidir.

Birimler ve ölçüler için Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır.

**Araştırma Makaleleri:** Orijinal araştırma makaleleri aşağıdaki ana konu sıralamasına göre dizilmelidir: Başlık, Yazar adları (Sorumlu yazar (\*) ile işaretlenmeli), Yazar adresleri, Yazar ORCID numaraları, Özet ve Anahtar kelimeler (3 - 6 kelime), İngilizce başlık, Abstract ve Keywords ile Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür veya Bilgilendirme ile Kaynaklar. Her bir Tablo ve Şekil ayrı sayfalarda yer almalıdır.

## YAZIM DÜZENİ

**Özet:** Orijinal araştırma makalelerinde 250, diğer makale türlerinde 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** En fazla 6 tane olmak üzere her iki dildeki özeti altında alfabetik sırayla verilmelidir. Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri arasından seçilmelidir. Anahtar kelimelerin seçiminde Türkiye Bilim Terimleri internet adresinden (<http://www.bilimterimleri.com>) yararlanılmalıdır.

**Giriş:** Sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Giriş'te çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır.

**Materyal ve Metot:** Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. Uluslararası indeksli dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması gereklidir. Makalede etik kurul izni ve/veya yasal/özel izin alınmasının gerekip gerekmediği bu bölümde belirtilmelidir. Materyal olarak hayvan kullanılan orijinal araştırma makalelerinde (klinik, deneysel, saha çalışmaları vb.); etik kurul onayı alınmış olmalıdır. Etik kurul onay/izin belgesinin "alındığı etik kurulun ismini, sayısını ve tarihini" içeren açıklayıcı bilgiler materyal ve metot bölümüne yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.

**Bulgular:** Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde verilmelidir. Bulgular, gerektiğinde tablo ve şekillerle desteklenmeli ve kısa olarak sunulmalıdır.

**Tartışma ve Sonuç:** Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden literatürler ışığında tartışılmalı ve bulguların önemi vurgulanmalıdır. Sonuç ya da öneri cümlesi ile bitirilmelidir.

**Teşekkür:** Çalışma veya makaleye kişisel katkı ve parasal destek burada belirtilmelidir.

**Derleme:** Derginin yayın alanlarındaki konularda yenilikleri içeren, güncel kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmış makaleler olup, yazarların konu ile doğrudan ilişkili en az 3 adet çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır). Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde değerlendirmeye alınan ve yayınlanan derlemeler **çağrılı derlemelerden** oluşmaktadır. Derlemelerde; Özet, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar bölümleri bulunmalıdır.

**Olgu Sunumu:** Yazarların, karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. En fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Olgu sunumları; Özet, Giriş, Olgu tanımı, Tartışma ve Sonuç ile Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır.

**Kısa Bilimsel Makale:** Kısa bilimsel makalelerde dar kapsamlı olarak ele alınmış, yeni bilgi ve bulgular sunulmalıdır. Araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve en fazla 5 sayfa olmalıdır. En fazla 2 tablo veya şekil içermelidir.

## Kaynaklar

Metin içinde atıf yapılırken;

1. Yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir; Adams (1998) tarafından; Wilkie ve Whittaker (1997) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından....
2. Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir; ... bildirilmiştir (Adams, 1998); .... bildirilmiştir (Wilkie ve Whittaker, 1997); ..... bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007).
3. Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda önce alfabetik sonra kronolojik sıralama yapılmalıdır; .... bildirilmiştir (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle ve ark., 2007; Wilkie ve Whittaker, 2006).
4. Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir; .... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

**Kaynak listesi aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır:**

1. **Kaynak listesi yazar soyadına göre alfabetik olarak sıralanmalıdır.**
2. **Kaynaklarda yer alacak dergi adları ISI web of Science'a göre kısaltılmalı ve italik yazılmalıdır.**
3. **Kaynakların yazın şekli aşağıdaki şekilde olmalıdır.**

**Makale;** Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

**Kitap;** Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Kitaptan bir bölüm:** Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. **Web sayfası:** Anonim (1) <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2010.

**Tez:** Er A, 2009: Makrolid grubu antibiyotiklerin endotoksemide sitokin düzeylerine etkisi. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Bilimsel toplantıda sunulan bildiri:** Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

**Tablo ve Şekiller:** Her bir tablo ve şekil ayrı sayfalara yerleştirilmelidir. Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları makalenin yazım dilinde tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir. Şekil başlıkları makalenin yazım dilinde şeklin alt bölümüne yazılmalıdır.

## HARRAN UNIVERSITY VETERINARY FACULTY JOURNAL PUBLICATION RULES \*

- 1- Journal of Harran University Veterinary Faculty is a refereed journal that publishes original clinical and experimental research in Turkish and English, covering human and animal health, especially in the field of Veterinary Science, case reports, reviews (at least 3 on the subject of compilation of the invited or responsible author) the research paper must be on the reference list), short scientific articles and letters to the editor. Publishing articles in English is given priority in the journal. The journal is published electronically every 6 months and 2 issues a year. There are no fees for published articles.
- 2- Publications accepted to the journal should not have been published elsewhere. It should not have been submitted to other journals for review simultaneously. All legal and criminal liability arising from the published articles belong to the authors. Authors are not paid the right to publish. Submitted articles and their attachments are not returned, whether the article is published or not.
- 3- The works that have been previously communicated in congresses and published with a summary are accepted to be stated on the cover page. However, if the publication is produced from the thesis and there is a supporting organization, it should be stated in the publication.
- 4- The article that reaches the Journal Editor is subjected to preliminary evaluation by the journal editor. Editing has the right to reject the article according to the preliminary evaluation result or to request correction before subjection to the reviewer.
- 5- Articles are sent to at least two referees for evaluation. In the article acceptance process, if the opinions of the two referees differ, the editor decides by taking the opinion of a third referee or advisory board.
- 6- TUBITAK ULAKBIM respect for ethical principles, which opened to the use of all universities in Turkey "iThenticate" sent through plagiarism detection program, the whole article, must be made of the case report and review of the preliminary assessment and the delivery of results. According to these preliminary evaluation results, the similarity rate of articles, case reports or reviews with other references should not exceed 15% (excluding abstract, abstract and references). Articles, case reports or reviews sent to our journal for publication will not be evaluated if the similarity rate exceeds 15% in the evaluation made through the "ithenticate" program.
- 7- At least 20% of references to any submitted article (for all article categories) must include references published in the last five years. Anonymous references should be kept to a minimum.
- 8- If the article is accepted for publication, the Copyright Transfer Agreement, which includes the declaration that any right of publication has been transferred, must be signed by all authors and sent to the journal editor before printing. Articles without Copyright Transfer Agreement are not published even if they are accepted to publish.
- 9- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. When the works are sent to <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>, they are taken into the evaluation process.
- 10- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. Works must be saved in MS Word format, all photographs (pictures) at least 300 dpi resolution, in TIFF or JPEG format.

## WRITING RULES

Manuscripts should be prepared in MS Word format, Times New Roman font, with 12 font size, double line spacing and 2.5 cm space on each side. Line numbers (continually starting from page 2 of the article) should be added to the article. Articles of this type should not exceed 15 pages in original scientific research and reviews, including figures and tables, and 5 pages in short scientific articles and case reports.

International Standard Units (SI-system) should be used for units and dimensions.

Research Articles: Original research articles should be arranged in the order of the following main topics: Title, Author names (must be marked with the responsible author (\*)), Author addresses, Author ORCID numbers, Abstract and Keywords (3 - 6 words), English title, Abstract and Introduction to Keywords, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, Thanks or Information and References. Each Table and Figure should be on separate pages.

## STYLE AND FORMAT

Abstract: It should be prepared not to exceed 250 words in original research articles and 200 words in other types of articles.

Keywords: It should be given in alphabetical order below the summary in both languages, maximum 6. Keywords should be selected from Turkey Science Terms. Turkey Science Terms in the selection of keywords from the internet address (<http://www.bilimterimleri.com>) should be utilized.

Introduction: In order for the results to be understood and interpreted, information about the studies done on that subject should be included. In the introduction, the hypothesis of the study should be specified. The purpose of the study should be clearly written at the end of this section.

Material and Method: Experimental studies should be given in this section with sufficient detail that can be repeated by other researchers. When using a technique described in an article published in international indexed journals, it is necessary to describe the method very briefly and to cite the relevant original article. In the article, it should be stated in this section whether the ethical committee permission and / or legal / special permission should be obtained. In original research articles using animals as materials (clinical, experimental, field studies, etc.); ethics committee approval must have been obtained. Explanatory information including the name, number and date of the ethics committee's ethics committee approval / permit document should be written in the material and method section. The editorial board has the right to request the ethics committee approval document.

Results: Research findings should be given clearly and understandably. Findings should be supported with tables and figures when necessary and presented briefly.

Discussion and Conclusion: Findings should be discussed in the light of the literature before going into unnecessary detail and the importance of the findings should be emphasized. It should be finished with a conclusion or suggestion sentence.

Acknowledgment: Personal contribution and monetary support to the study or article should be stated here.

Compilation: These are articles that contain innovations on the subjects of the journal's publications and are prepared by using current references. If the authors have at least 3 works directly related to the subject and they can be accepted for publication. When submitting his review, the responsible author should send the imprint information of the articles related to the subject to the editor of the journal (article tags must be presented on the last page of the article text). Reviews compiled and published in Harran University Veterinary Faculty Journal are invited reviews. In the compilation; Summary, Introduction, Conclusion and References sections should be available.

Case Report: These are the works that contain information of scientific value that the authors discuss the new or rare cases that they encounter. Maximum 15 references should be used and care should be taken to keep these references up to date. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Scientific Article: In short scientific articles, it should be handled narrowly and new information and findings should be presented. It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. Must contain no more than 2 tables or figures.

References:

While citing in the text;

1. The publication year of the reference should be specified in parentheses after the surname of the author or authors; By Adams (1998); By Wilkie and Whittaker (1997); Doyle et al. (2007) by....

2. When cited at the end of the sentence, the name of the author and the year of publication must be indicated in parentheses; ... have been reported (Adams, 1998); .... has been reported (Wilkie and Whittaker, 1997); ..... has been reported (Doyle et al., 2007).

3. In case of reference to more than one reference, first alphabetical and chronological order should be done;

.... reported (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle et al., 2007; Wilkie & Whittaker, 2006).

4. If the same author has publications in the same year, each should be marked in lowercase letters, starting with the letter "a";

.... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

The list of references should be prepared as follows:

1. Reference list should be listed alphabetically by author surname.

2. The names of the journals in the references should be shortened according to the ISI web of Science and should be written in italics.

3. Type of references should be as follows.

Journal article; Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

Book; Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.



Chapter in a book: Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. Web page: Anonymous (1) <http://www.emea.europa.eu>, Access date; 01.04.2010.

Thesis: Er A, 2009: Effect of macrolide antibiotics on cytokine levels in endotoxemia. PhD thesis, SU Health Sciences Institute, Konya.

Paper presented at the scientific meeting: Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

Tables and Figures: Each table and figure should be placed on separate pages. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations and necessary explanations used in the table should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU

### Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğüne

Biz aşağıda adı, soyadı ve imzaları bulunan yazarlar, tarafımızdan yazılmış,

.....  
.....

İsimli makalenin içeriği, sonuçları ve yorumları konusunda, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımadığını kabul ederiz. Sunduğumuz makalenin orijinal olduğunu, herhangi bir başka dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini, daha önce yayınlanmadığını beyan ederiz. Makalenin telif hakkından feragat etmeyi kabul ederek sorumluluğu üstlenir ve imza ederiz. Makalenin telif hakkı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne devredilerek yayınlanması konusunda yetkili kılınmıştır.

Bununla birlikte yazarların aşağıdaki hakları saklıdır:

1. Telif Hakkı dışında kalan patent v.b. bütün tescil edilmiş haklar.
2. Yazarın gelecekteki kitaplar ve dersler gibi çalışmalarında; makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı.
3. Makaleyi ticari amaçlarla kullanmamak koşulu ile çoğaltma hakkı.

Yazarın Adı ve Soyadı

Tarih

İmza

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

**Sorumlu yazarın adı/yazışma adresi:**

.....

Telefon: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Makale başvurusu ile bu formu bütün yazarlar tarafından imzalanmış olarak "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" adresinden yükleviniz.)*

**COPYRIGHT TRANSFER FORM**

We grant that Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has no responsibility for the content, results and conclusions of the manuscript entitled,

.....  
.....

We state that the submitted manuscript is original, has not been published or is not being considered for publishing elsewhere. We grant to disclaim the copyright and sign this form by undertaking all responsibility. Hereby Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has been authorized for publishing by transferring the copyright of the manuscript.

However the following rights of the author(s) are reserved:

1. All other rights such as patent right.
2. The rights for using the manuscript as a whole or a part in their future Works such as books or lectures without paying any charge.
3. The rights for reproducing the manuscript for purpose other than commercial use.

<u>Name and Surname of the Author</u>	<u>Date</u>	<u>Signature</u>
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

**Address of the Corresponding Author:**

.....  
.....

Phone: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Upload the form to "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" after filling it.)*

