

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Determination of Antibacterial and Antioxidant Activities of Juniper (*Juniperus oxycedrus* L.) Essential Oils and Aromatic Water** 88
Katran Ardıcı Meyvesi (*Juniperus oxycedrus* L.) Aromatik Yağı ve Aromatik Suyunun Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi
A.R. ISIK, S. OZKAYA, S. ERBAS, H. KOKNAROGLU
- Kayseri İli Yahyalı İlçesi Süt Sığırcılık İşletmelerinde Suni Tohumlama Uygulamaları ve Başarıyı Etkileyen Faktörler** 95
Artificial Insemination Applications and The Factors Affecting Its Success in Dairy Cattle Enterprises in Yahyalı District of Kayseri Province
H. YILMAZ, S. SARIÖZKAN
- Rabbit Liver Lobes: An Anatomical Study of Experimental Surgical Approaches**..... 103
Tavşan Karaciğer Lobları: Deneysel Cerrahi Yaklaşımlarına İlişkin Anatmik Bir Çalışma
F. SEVİL-KILIMCI
- Kedilerde Medetomidin-Ketamin ve Zolazepam-Tiletamin Anestezilerinin Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması**..... 109
Comparison of the Effects of Medetomidine-Ketamine and Zolazepam-Tiletamine Anesthesia on Hematologic and Biochemical Parameters in Cats
N. APAYDIN, M. AYDINGÜLER
- Hasat Zamanının Meryemana Dikeninin (*Silybum marianum*) Kompozisyonuna, Gaz Üretimine, Metan Üretimine, Sindirimine ve Metabolik Enerjisine Etkisi**..... 116
Effect of Harvest Stage on Chemical Composition, Gas Production, Methane Production, Digestibility and Metabolisable Energy of Milk Thistle (*Silybum marianum*)
A.A. KURT, A. KAMALAK
- Sığır Eti ve İç Organlarında Zeranol Kalıntısının Araştırılması**..... 121
Investigation of Zeranol Residue in Meat of Cattle and Internal Organs
T. ATABAŞ, N. ERTAŞ ONMAZ
- Gümüş@Grafen Oksit Nanokompozitin Biyolojik Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi**..... 126
Biosynthesis of Silver@Graphene Oxide Nanocomposite and Determination of It's Antimicrobial Activity
F.D. KOCA
- İneklerde Meme Başı Kanalının Ultrasonografik Ölçümlerinin Mastitis ile İlişkisi**..... 131
The Relationship Between Ultrasonographic Measurements of Teat Canal and Mastitis in Cows
G. SEKMEN, T. ŞAFAK, Ö. YILMAZ, B.F. YÜKSEL, A. RIŞVANLI, İ. ŞEKER
- Fluoxetine and *Gundelia tournefortii* L. Plant Extract in Rats Exposed to Chronic Immobilization Stress; Determination of Effect on Anxiety, Motor Activity, Kidney and Liver Tissues**..... 138
Kronik Immobilizasyon Stresine Maruz Bırakılan Ratlarda Fluoksetin ve *Gundelia tournefortii* L. Bitki Ekstresinin; Anksiyete, Motor Aktivite, Böbrek ve Karaciğer Dokuları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi
H. YUKSEL, B. BATI, G. OTO, O. BINGOL
- Tüketime Hazır Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması**..... 149
Presence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods
S. AL, M. BAREL, A. DIŞHAN, F. KARADAL, H. HIZLISOY, N. ERTAŞ ONMAZ, Y. YILDIRIM, Z. GÖNÜLALAN
- Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi**..... 156
and Determination of Hepatic Apoptosis and Caspase Activity
G. EKEBAŞ, A. ATASEVER, M. ŞENTÜRK, D. YAMAN GRAM, M. EREN
- Kısa Süreli Saklanan Tavşan Spermasının Spermatolojik Parametreleri Üzerine Taxifolinin Etkileri**..... 164
The Effects of Taxifolin on Spermatological Parameters of Liquid Stored Rabbit Semen
S. SEVİM, S. SARIÖZKAN

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Analytical Methods for Determination of Aflatoxin B₁ in Animal Feeds and Feedstuffs**..... 173
Hayvan Yem ve Yem Hammaddelerinde Aflatoxin B₁'in Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri
S. MUSHTAQ, Y.K. DAŞ, A. AKSOY
- Köpeklerde Retinanın Tanısal Görüntülenmesi**..... 180
Diagnostic Imaging of Retina in Dogs
Ö. ŞENGÖZ ŞİRİN, G. ARIKAYA

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- Rahvan Koşu Atında Aortik Regürgitasyon Olgusu**..... 187
Case of Aortic Regurgitation in a Amble Racehorse
İ. KARACA BEKDİK, Ö. DENİZ, M. VURUCU, Ö. ASLAN



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

17(2): 88-190, 2020

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

ISSN-1304-7280

Yıl/Year: 2020
Cilt/Volume: 17
Sayı/Number: 2

Yılda 3 sayı yayımlanır / Published 3 issues per year
<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercvet@gmail.com

ISSN-1304-7280



Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2020
Cilt / Volume : 17
Sayı / Number : 2

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Ağustos 2020

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Dekan)

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Aytaç AKÇAY (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Mukaddes BAREL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

Okt. Mustafa AKGÜL (Erciyes Üniv. Yabancı Diller YO.)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ali AYDIN (İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Aytekin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Assoc. Prof. Dr. Corneliu BRASLASU (Univ. Agricultural Sci. Vet. Med, Bucharest)

Prof. Dr. Ender YARŞAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Gediminas VALKIUNAS (Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Ass. Prof. Dr. Klaus RIEDELBERGER (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ (Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY (Erciyes Üniv. Tıp Fak.)

Prof. Dr. Mustafa GARİP (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oğuz KUL (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oktay GENÇ (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Özcan ÖZGEL (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Rahşan ÖZEN (Fırat Üniv. Vek. Fak.)

Prof. Dr. Sinan AKTAŞ (Atatürk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Staffan BENSCH (University of Lund, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI (Balıkesir Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Thomas RÜLİCKE (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas WITTEK (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dergisi Editörlüğü
38039-Kayseri / TÜRKİYE

http://ercivet.erciyes.edu.tr

E-posta : ercivet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli/ Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Sayfa / Page

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Determination of Antibacterial and Antioxidant Activities of Juniper (*Juniperus oxycedrus* L.) Essential Oils and Aromatic Water** 88
Katran Ardıcı Meyvesi (*Juniperus oxycedrus* L.) Aromatik Yağı ve Aromatik Suyunun Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi
A.R. ISIK, S. OZKAYA, S. ERBAS, H. KOKNARUGLU
- Kayseri İli Yahyalı İlçesi Süt Sığırcılık İşletmelerinde Suni Tohumlama Uygulamaları ve Başarıyı Etkileyen Faktörler** 95
Artificial Insemination Applications and The Factors Affecting Its Success in Dairy Cattle Enterprises in Yahyalı District of Kayseri Province
H. YILMAZ, S. SARIÖZKAN
- Rabbit Liver Lobes: An Anatomical Study of Experimental Surgical Approaches**..... 103
Tavşan Karaciğer Lobları: Deneysel Cerrahi Yaklaşımlarına İlişkin Anatomi Bir Çalışma
F. SEVİL-KILIMCI
- Kedilerde Medetomidin-Ketamin ve Zolazepam-Tiletamin Anestezilerinin Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması**..... 109
Comparison of the Effects of Medetomidine-Ketamine and Zolazepam-Tiletamine Anesthesia on Hematologic and Biochemical Parameters in Cats
N. APAYDIN, M. AYDINGÜLER
- Hasat Zamanının Meryemana Dikeninin (*Silybum marianum*) Kompozisyonuna, Gaz Üretimine, Metan Üretimine, Sindirimine ve Metabolik Enerjisine Etkisi**..... 116
Effect of Harvest Stage on Chemical Composition, Gas Production, Methane Production, Digestibility and Metabolisable Energy of Milk Thistle (*Silybum marianum*)
A.A. KURT, A. KAMALAK
- Siğir Eti ve İç Organlarında Zeranol Kalıntısının Araştırılması**..... 121
Investigation of Zeranol Residue in Meat of Cattle and Internal Organs
T. ATABAŞ, N. ERTAŞ ONMAZ
- Gümüş@Grafen Oksit Nanokompozitin Biyolojik Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi**..... 126
Biosynthesis of Silver@Graphene Oxide Nanocomposite and Determination of It's Antimicrobial Activity
F.D. KOCA
- İneklere Meme Başı Kanalının Ultrasonografik Ölçümlerinin Mastitis ile İlişkisi**..... 131
The Relationship Between Ultrasonographic Measurements of Teat Canal and Mastitis in Cows
G. SEKMEN, T. ŞAFAK, Ö. YILMAZ, B.F. YÜKSEL, A. RIŞVANLI, İ. ŞEKER
- Fluoxetine and *Gundelia tournefortii* L. Plant Extract in Rats Exposed to Chronic Immobilization Stress; Determination of Effect on Anxiety, Motor Activity, Kidney and Liver Tissues**..... 138
Kronik Immobilizasyon Stresine Maruz Bırakılan Ratlarda Fluoksetin ve *Gundelia tournefortii* L. Bitki Ekstresinin; Anksiyete, Motor Aktivite, Böbrek ve Karaciğer Dokuları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi
H. YUKSEL, B. BATI, G. OTO, O. BINGOL
- Tüketime Hazır Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması**..... 149
Presence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods
S. AL, M. BAREL, A. DIŞHAN, F. KARADAL, H. HIZLISOY, N. ERTAŞ ONMAZ, Y. YILDIRIM, Z. GÖNÜLLALAN
- Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi**..... 156
and Determination of Hepatic Apoptosis and Caspase Activity
G. EKEBAŞ, A. ATASEVER, M. ŞENTÜRK, D. YAMAN GRAM, M. EREN
- Kısa Süreli Saklanan Tavşan Spermasının Spermatolojik Parametreleri Üzerine Taxifolinin Etkileri**..... 164
The Effects of Taxifolin on Spermatological Parameters of Liquid Stored Rabbit Semen
S. SEVİM, S. SARIÖZKAN

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Analytical Methods for Determination of Aflatoxin B₁ in Animal Feeds and Feedstuffs**..... 173
Hayvan Yem ve Yem Hammaddelerinde Aflatoxin B₁'in Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri
S. MUSHTAQ, Y.K. DAŞ, A. AKSOY
- Köpeklerde Retinanın Tanısal Görüntülenmesi**..... 180
Diagnostic Imaging of Retina in Dogs
Ö. ŞENGÖZ ŞİRİN, G. ARIKAYA

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- Rahvan Koşu Atında Aortik Regürgitasyon Olgusu**..... 187
Case of Aortic Regurgitation in a Amble Racehorse
İ. KARACA BEKDİK, Ö. DENİZ, M. VURUCU, Ö. ASLAN



Determination of Antibacterial and Antioxidant Activities of Juniper (*Juniperus oxycedrus L.*) Essential Oils and Aromatic Water*

Ali Riza ISIK¹, Serkan OZKAYA¹, Sabri ERBAS², Hayati KOKNAROGLU¹

¹Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, Department of Animal Science, Isparta-TURKEY

²Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, Department of Industrial Plants, Isparta-TURKEY

Corresponding author: Serkan OZKAYA, E-mail: serkanozkaya@isparta.edu.tr ORCID: 0000-0003-3389-0188

How to cite: Isık AR, Ozkaya S, Erbas S, Koknaroglu H. Determination of antibacterial and antioxidant activities of juniper (*Juniperus oxycedrus L.*) essential oils and aromatic water. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 88-94.

Summary: The purpose of this study was to determine the antibacterial-antioxidant properties of essential oil (EO) and aromatic water (AW) obtained from juniper fruit (*Juniperus oxycedrus L.*) and to investigate its possible use in animal husbandry. The EO and AW were obtained by means of distillation method from the juniper fruit collected from Isparta province. Total phenolic compounds in EO and AW were observed as 5.25, and 1.82 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, respectively. The highest phenolic compounds found were 77.89% α -pinene in EO and 55.43% α -cedrol in AW. The free radical trapping activity of EO and AW was found as 82 and 45.5% in 100 μ l/ml, respectively. At total antioxidant capacity (TAC) analysis, this value was obtained as 27.61 mmol Trolox equiv./lt in EO and 5.54 mmol Trolox equiv./lt in AW. The MIC (Minimum inhibition concentration) analyses, it was observed that EO and AW suppressed the growth of *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter* and *Salmonella* bacteria in different concentrations. Besides, it was found that the effect of AW was not effective while EO suppressed the growth of *Lactobacillus rhamnosus* bacteria. In the preliminary study performed on calves (n= 5), adding EO and AW to milk did not have any negative effect on milk consumption. As a result of these findings, it was observed that both EO and AW had antibacterial-antioxidant activity. However, studies on live material will allow a better evaluation of the results and effects on live material.

Key words: Antibacterial-antioxidant activity, aromatic water, essential oil, juniper fruit

Katran Ardıcı Meyvesi (*Juniperus oxycedrus L.*) Aromatik Yağı ve Aromatik Suyunun Antibakteriyel and Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Özet: Çalışmada katran ardıcı meyvesinden elde edilen yağ ve aromatik suyun antibakteriyel-antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ve hayvancılıkta kullanım olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Yağ ve aromatik su, Isparta ve çevresinden toplanan katran ardıcı meyvelerinden destilasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Katran ardıcı yağ (AY) ve aromatik suyunda (AS) toplam fenolik bileşenler sırasıyla 5.25 ve 1.82 mg GAE/g olarak elde edilmiştir. En yüksek fenolik bileşen yağda %77.89 ile α -pinen, aromatik suda ise %55.43 ile α -cedrol olarak belirlenmiştir. AY ve AS'nun serbest radikal yakalama aktivitesi 100 μ l/ml'de sırası ile %82 ve 45.5 olarak belirlenmiştir. Yapılan toplam antioksidan kapasite (TAK) analizi sonucunda bu değer AY'da 27.61 mmol Trolox equiv./lt, AS'ta ise 5.54 mmol Trolox equiv./lt olarak elde edilmiştir. Yapılan MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu) analizleri sonucunda AS ve AY'nin *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter* ve *Salmonella* bakterilerinin gelişimlerini değişik konsantrasyonlarda baskıladıkları gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, AY'nin *Lactobacillus rhamnosus* bakteri gelişimini baskımlarken AS'nin etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Buzağılarda (n=5) yapılan ön çalışmada AY ve AS ilave edilen sütlerin tüketiminde bir olumsuzluk gözlemlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında hem AY'nin hem de AS'nin antibakteriyel-antioksidan aktivitesinin olduğu gözlemlenmiştir. Ancak canlı materyal üzerinde yapılacak olan çalışmalar sonuçların daha iyi değerlendirilmesine ve canlı materyal üzerine etkilerinin belirlenmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel-antioksidan aktivite, aromatik su, esansiyel yağ, katran ardıcı meyvesi

Introduction

In the livestock sector, antibiotics were widely used to regulate the use of feed and to prevent disease and metabolic disorders. In recent years, the re-

striction and prohibition of antimicrobial agents in animal diets has led to the direction of research into the use of plant extracts as feed additives in animal production. Essential oils obtained from plants are safe and are classified as safe additives when consumed by humans and animals (FDA, 2018).

In many countries of Europe and the world, Junipers are considered very important due to their pharmacological properties. As in all over the world, Juniper has become an indispensable plant from the fruits

Geliş Tarihi/Submission Date : 24.06.2019
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.12.2019

* This work is presented at 13th National Animal Science Congress of Students (Bu çalışma "13. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresinde" özet metin olarak sunulmuştur).

and leaves of which Anatolian people have benefited. In diseases such as pain, cough, rheumatism, tuberculosis, medications prepared from its roots and mostly from its fruit are used as an antiseptic (Tumen and Hafizoglu, 2003). *J. oxycedrus* L. species, naturally found in Turkey, is rich in essential oils, tannins, flavonoids, resins, lignin and triterpenes (Tumen and Hafizoglu, 2003). Juniper cones and leaves are used in medicine and cosmetic industry in the treatment of skin diseases, worm-shedding, stimulants and antiseptics (Dogan et al., 2016). Juniper is known to be suitable for diseases such as skin inflammation, headaches, diabetes, digestive tract diseases, bronchitis, respiratory diseases such as asthma, kidney and urinary tract diseases, jaundice, sciatica, rheumatism, sinusitis, liver disorders, metabolism disorders and used against these disorders (Koc, 2002; Gulsoy et al., 2017).

Antioxidant compounds such as polyphenol are common in plants, but they are also present in high concentrations in fruits such as apple, grape, blackberry, and strawberry. These compounds have radical cleansing properties and are used as protection against cardiovascular diseases (Wang and Jiao, 2000; Hertog et al., 1995).

Free radicals can be produced through metabolic sources in cells as well as through external sources such as nutrients, drugs and environmental pollution. Free radicals can damage macromolecules such as proteins, DNA and lipids and cause damage to different tissues. Natural antioxidants can be used as inactivators of free radicals (Miliauskas et al., 2004).

In this study, the essential oil components, phenolic contents, antiradical, antioxidant-antibacterial activities of juniper oil and aromatic water obtained from juniper fruit along with possible use in animal husbandry especially in calf feeding-breeding were investigated.

Material and Methods

J. oxycedrus L., which used as material, were collected from the trees growing naturally in Isparta province in March-April. The collected fruits were dried at room temperature in the Animal Science Department laboratory.

Distillation

A hundred gram fresh juniper fruit was filled into the 5L balloon in the Clevenger hydrodistillation device, and 1.5 L of distilled water was added over 3 hours (European Pharmacopoeia, 1975). At the end of the distillation, EO and AW were obtained. The distillation process was performed on 3 separate Clevenger devices (3 replication) and required amounts of juniper EO, and AW produced in other laboratory analyses.

GC-MS analysis; at the end of distillation, Juniper EO and components were determined in GC-MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) device (QA-5050 quadrupole detector Shimadzu 2010 Plus). The GC-MS operating conditions were as follows: As a capillary column, CP-Wax 52 CB (50 m x 0.32 mm. 0.25µm) was used in the analyses. The furnace temperature program increased by 10°C per minute from 60°C to 220°C and it was kept at 220°C for 10 minutes. The total analysis lasted 60 minutes, the injector temperature was 240°C and the detector temperature was 250°C. Helium (20 mL/min, split 1:20) gas was used as a carrier gas. Wiley, Nist, Tutor, FFNSC library was used to identify essential oil components.

Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined according to Singleton and Rossi (1965) by Folin-Ciocalteu colorimetric method. Spectrophotometer readings were performed at a wavelength of 765 nm. In all samples, the total phenolic content was calculated by creating a calibration chart in gallic acid. The analyses were carried out with 5 replications.

Determination of phenolic compounds by HPLC; Phenolic material contents of the samples were determined by Shimadzu brand High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Caponio et al. (1999). Samples and phenolic standards were filtered through a 0.45 µm membrane, phenolic compounds and amounts (µg/ml) determined.

Antioxidant analyses

Determination of antiradical activity (DPPH); The activity was determined by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Shimada et al., 1992). 1 mL of 0.2 mM DPPH was added on 1 mL of the sample (50, 100, 250 ppm concentrations) and was mixed well with the vortex. After waiting 30 minutes at room temperature and in the dark environment, the readings were made at 517 nm. The analyses were carried out with 5 replications. The free radical binding activity of the samples was calculated using the following formula: Antiradical activity (%) = ((absorbance value of control absorbance value of the sample) / absorbance value of the control) * 100

Iron reduction power (FRAP)

Iron reduction power was performed using the method of Oyaizu (1986). Accordingly, 2.5 mL of 200 mM sodium phosphate added on 2.5 mL of the sample (pH: 6.6) and 2.5 mL %1 potassium ferricyanide was added and mixed. Samples were incubated at 50°C for 20 min, then 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added and centrifuged at 200xg for 10 min 5 mL of the supernatant added and 1 mL of 0.1% iron chloride added with 5 mL of deionised water. The sam-

ples' absorbance values were measured by spectrophotometer at 700nm wavelength. Since the high absorbance value is expressed as high iron reduction power, the absorbance values obtained from the samples are compared with synthetic antioxidants such as Butylatedhydroxyanisole (BHA), Butylatedhydroxytoluene (BHT) and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). The iron binding forces of the samples were revealed.

Testing of antimicrobial activity as Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Minimum inhibition concentration: It is expressed as the minimum value of the concentration of microorganisms.

MIC test was determined using Broth Dilution method. Mueller-Hinton broth was used for MIC testing. In different concentration, microorganisms were incubated in the MHB medium containing the juniper fruit oil and aromatic water. At the end of the appropriate incubation according to the type of microorganisms, the first concentration in which growth was not realized was accepted as the MIC value.

Antimicrobial MIC test as a pathogen; *S.aureus*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. and lactic acid bacteria were used in the non-pathogenic group (Koneman et al., 1992). Bio Tek Epoch UV/Vis. Microplate spectrophotometry was used for the MIC analysis of antimicrobial activity.

Determination of total antioxidant and oxidant capacity

Rel Assay Kits (Baran Medical, Turkey) which an automatic method developed by Erel (2004; 2005) was used to determine to Total antioxidant capacity (TAC) and Total oxidant capacity (TOC) measurements (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Inst. Ltd. UK). Oxidant status index (OSI) was calculated from the following formula (Mercan, 2004; Kamiloglu et al., 2011):

$$OSI = TOC / (TAC * 10)$$

EO and AW added milk consumed by calves

At the end of the MIC analysis, the highest concentration dose was added to the calves' milk, and the milk consumption of the calves (n=5) was observed.

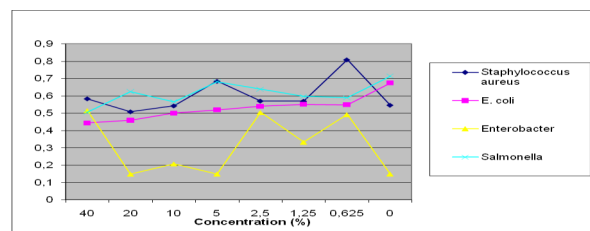
Results

Antimicrobial activity

The results of MIC analysis showed that AW suppressed the growth of pathogenic bacteria; however, some bacteria continued to grow after certain concentrations (Figure 1). The growth of *E. coli* and *Salmonella* bacteria was suppressed at a concentration of 40%, while *S. aureus* and *Enterobacter* were sup-

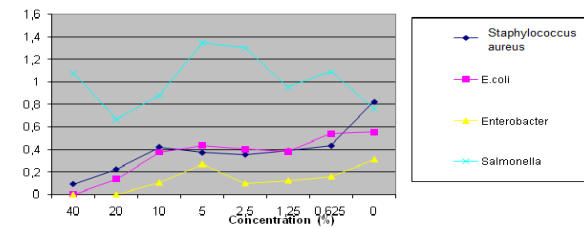
pressed at a concentration of 20%.

EO application stopped the growth of other bacteria except for *Salmonella* at 40% concentration (Figure 2). EO suppressed the growth of *S. aureus* to a concentration of 20%; however, the growth of this bacterium continued at 40% concentration. When the effect of EO and AW on *lactic acid* bacteria was examined, it was observed that EO completely stopped the growth of the bacterium at 40% concentration and that AW did not affect the growth of bacteria (Figure 3).



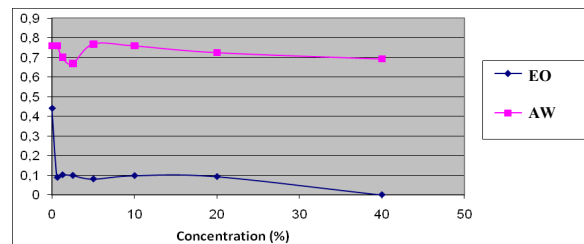
BD: Bacterial density

Figure 1. Effect of Juniper AW on pathogenic bacteria



BD: Bacterial density

Figure 2. Effect of Juniper EO on pathogenic bacteria



BD: Bacterial density

Figure 3. Effect of Juniper EO and AW on non-pathogenic bacteria

Total antioxidant and oxidant capacity

Total phenolic content and antioxidant activity of EO and AW are shown in Table 1. The total phenolic content of EO and AW were 5.25 and 1.85 mg GAE/g, respectively. The antioxidant activity of 250µl/ml EO approached the level of synthetic antioxidants

(96.4). This value at the same concentration obtained as 70.7 in AW. When the TOC and TAC values of EO and AW were examined (Table 2), it was determined that the TAC of EO and AW was higher than TOC value.

were added to the milk of calves. EO and AW equally divided into morning and evening meals and fed to calves. EO and AW supplemented milk was completely consumed by calves and there was no negative effect on milk consumption.

Total phenolic compounds

Table 1. Total phenolic content and antioxidant activity of Juniper EO and AW (N=5)

	Total phenolic (mg GAE/g) Mean±S.E.	Antiradical % (50 µl/ml) Mean±S.E.	Antiradical % (100 µl/ml) Mean±S.E.	Antiradical % (250 µl/ml) Mean±S.E.	Iron reduction (50 µl/2.5 ml) Mean±S.E.	Iron reduction (250 µl/2.5 ml) Mean±S.E.
Juniper EO	5.25±0.08	55.8±1.08	82.0±2.15	96.4±1.14	1.31±0.07	10.01±0.16
Juniper AW	1.85±0.04	29.5±2.00	45.5±1.19	70.7±1.29	0.51±0.04	4.49±0.10
Trolox		85.4±0.12	91.6±0.11	97.5±0.12	3.33±0.03	10.95±0.03
BHT		94.9±0.01	95.0±0.04	97.6±0.15	6.32±0.08	23.66±1.07
BHA		97.1±0.03	96.9±0.01	98.9±0.04	3.64±0.03	18.54±0.80

BHA: Butylatedhydroxyanisole, BHT: Butylatedhydroxytoluene, Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

Table 2. Total antioxidant and oxidant capacity of Juniper EO and AW

	TAC	TOC	OSI
Juniper EO	27.61	23.91	0.08
Juniper AW	12.91	4.54	0.03

TAC: Total antioxidant capacity (mmol Trolox Equivalent), TOC: Total oxidant capacity (µmol H₂O₂/L), OSI: Oxidative stress index

Table 3. The percentage values of the components of EO and AW obtained from *J. oxycedrus* L.

EO components of <i>J. oxycedrus</i> L.	%
α-pinene	77.89
α-Cedrol	5.00
β-Myrcene	3.77
β-pinene	2.48
Limonene	2.00
α-Terpinolene	1.44
Germacrene-D	1.39
γ-terpinene	1.00
AW components of <i>J. oxycedrus</i> L.	%
α-Cedrol	55.43
Verbenone	20.20
Verbenol	14.72
Borneol	6.07
trans-Pinocarveol	3.59

The phenolic compounds of EO and AW obtained from *J. oxycedrus* L. fruit and leaves are given in Table 3. The highest phenolic component observed was α-pinene (77.89%) in EO as whereas α-cedrol in AW (55.43%).

EO and AW added milk consumed by calves

In the preliminary study, 20% of Juniper EO and AW

Discussion and Conclusion

The effects of EO and AW on the growth of bacteria such as *S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter* and *Salmonella* were found to differ in different concentrations. However, it was concluded that the antibacterial effect of EO was better than that of AW. Although AW concentrations suppressed bacterial growth, EO completely stopped the growth of bacteria other than

Salmonella. Medini et al. (2013) indicated that the EO obtained from *J. oxycedrus* species has a strong antibacterial effect. Angioni et al. (2003) observed that *E. coli* bacteria developed resistance to *J. oxycedrus* EO; however, *S. aureus* bacteria were more sensitive, and their growth was better suppressed than *E. coli*. In a study, Ozturk et al. (2011) indicated that the *Juniperus* species have various antibacterial effects; the effect on the growth of some microorganisms is strong, while the effects on the growth of some microorganism are weak, and some of them have little effect on growth. Many researchers have reported that the EO obtained from *Juniperus* species show high activity against *S. aureus* bacteria (Aridogan et al., 2002; Karaman et al., 2003). Miceli et al. (2009; 2011) reported that the *Juniperus* species which exist in Turkey could be used as a natural antibacterial agent. EO and AW obtained from *Juniperus phoenicea* which is Juniper species suppress the growth of gram-positive and negative bacteria, fungi and yeast. However, the EO obtained from their leaves are stronger than EO obtained from fruit (Ennajar et al., 2009). Many *Juniperus* species have antibacterial effects against many microorganisms (Cavaleiro et al., 2001; Angioni et al., 2003). The antibacterial effect of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* (Joo) and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* Ball. (Jom) species on gram-positive bacteria was determined by Taviano et al. (2013). The most basic compound of Juniper fruit was α -pinene. This compound shows high activity against bacteria and fungi species (Aligiannis et al., 2001). The α -pinene compound was in higher proportion than other compounds in *Juniperus* species (Chao et al., 2000). Hammer et al. (1999) reported that the active ingredients of cadine and pinene in *J. oxycedrus* species was high and suppressed the growth of *Enterobacter* and *S. aureus* species bacteria. The antibacterial properties of the *Juniperus* species are due to the high concentration of basic active ingredients such as α -pinene, α -terpinolene, limonene, β -myrcene and β -terpinene. These components show antibacterial effects (Alessandra et al., 2005; Ennajar et al., 2009). The antioxidant effect of EO was superior to that of AW. Ozturk et al. (2011) reported that the EO obtained from *Juniperus* species has high inhibitory properties of lipid peroxidation. In their study, Elmastas et al. (2006) reported that *Juniperus* species had an inhibitory effect on lipid peroxidation because of their high antioxidant properties. *J. oxycedrus* have high antioxidant properties and can be used instead of synthetic antioxidants. Loizzo et al. (2007)'s findings support this result. Similarly, Miceli et al. (2009) indicated that *Juniperus* species found in Turkey have high antioxidant properties and it can be used as a natural antioxidant. Lesjak et al. (2011) reported that *Juniperus sibirica* Burgsdorf species are high antioxidant properties and suppress some enzymes growth.

Iron reduction power increases due to increasing concentration. Iron reduction capacity has an important role in determining antioxidant activity (Meir et al., 1995). Elmastas et al. (2006) reported that the iron-reducing properties of *Juniperus* species increased due to the their concentration. Miceli et al. (2009) indicated that the iron-reducing capacity, which is an indication of antioxidant property, increased at increasing concentrations in *Juniperus* species.

Djeridane et al. (2006) reported a positive correlation between antioxidant properties and total phenolic content. Ennajar et al. (2009) reported that the correlation between the amount of phenolic substance and the antioxidant properties was high and increased the antioxidant activity due to the increase in the amount of phenolic substance. Antioxidant capacity of *Jom* species is very high; however, *Joo* species antioxidant capacity and iron capture power are reported to be low (Taviano et al., 2013).

The results showed that Juniper EO completely stopped the growth of pathogenic and non-pathogenic bacteria except for *Salmonella*, whereas AW had suppressed the growth of pathogenic bacteria and has no effect on the growth of non-pathogenic bacteria. Thus, it was observed that AW was selective antibacterial than EO. It is thought that iron reduction and antioxidant properties of EO are more favourable than AW, but both products can be used as natural antioxidant. Besides, studies on live material will enable us to interpret the effects of these products better.

In the preliminary study on the consumption of EO and AW supplemented milk for calves, no negative situation was observed regarding the use of supplemented milk. However, Juniper EO and AW consumption by calves could not be found, so no discussion was made.

Acknowledgements

We would like to thank Suleyman Demirel University Scientific Research Coordination Unit for supporting our study.

References

- Alessandra LO, Roberta BL, Fernando AC, Marcos NE. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). Food Chem 2005; 99: 1-5.
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. J Agric Food Chem 2001; 49: 811-5.
- Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition of the essential

- oils of *Juniperus* ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 2003; 51(10): 3073-8.
- Aridogan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Ozbasar D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 860-4.
- Caponio F, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chem* 1999; 64: 203-9.
- Cavaleiro C, Rezzi S, Salgueiro L, Bighelli A, Casanova J, da Cunha AP. Intraspecific chemical variability of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Niochem Syst Ecol* 2001; 29: 1175-83.
- Chao SC, Young DG, Oberg CJ. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res* 2000; 12: 639-9.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; 97(4): 654-60.
- Dogan G, Hayta S, Bagci E. Composition of the essential oil of *Juniperus excelsa* (Cupressaceae). *Duzce Univ J Sci Technol* 2016; 4: 243-51.
- Elmastas M, Gulcin I, Beydemir S, Kufrevioglu OI, Aboul-Enein HY. A study on the in Vitro antioxidant activity of Juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Anal Lett* 2006; 39: 47-65.
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *J Food Sci* 2009; 74(7): 364-71.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Chem* 2005; 38: 1103-11.
- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidative response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-9.
- European pharmacopoeia. *Maisonneuve Sainte Ruffine*, 1975; 3: 68.
- Food and Drug Administration of the US (FDA). Substances generally recognized as safe. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>. Access: 07.05.2019.
- Gulsoy S, Turhan UU, Ozkan G. Relationships between essential oil yield and physical properties of cones in juniper species (*Juniperus excelsa* Bieb. and *Juniperus foetidissima* Willd.). *Turk J For* 2017; 18(3): 219-25.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86: 985-90.
- Hertog ML, Feskens EM, Hollman PH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-diseases the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1995; 342: 1007-11.
- Kamiloglu NN, Beytut E, Kamiloglu A. Change in lipid peroxidation and antioxidant environment of spinal fluid with the use of bupivacaine for spinal anaesthesia. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2011; 17: 25-30.
- Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M, Adiguzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85(2-3): 231-5.
- Koc T. Bitkilerle Sağlıklı Yaşam. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 2002, Tokat, s. 102-4.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Diagnostic Microbiology*. 4th Ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992.
- Lesjak MM, Beara IN, Orcic DZ, Anackov GT, Balog KJ, Franciskovic MM, Mimica-Dukic NM. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem* 2011; 124(3): 850-6.
- Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem* 2007; 105(2): 572-8.
- Medini H, Manongiu B, Aicha N, Chekir-Ghedira L, Harzalla-Skhiri F, Khouja ML. Chemical and antibacterial polymorphism of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Cupressaceae) leaf essential oils from Tunisia. *J Chem* 2013.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1813-9.
- Mercan U. Importance of free radicals in toxicology. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2): 91-6.

- Miceli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, Bellinghieri V, La Barbera TM, Guvenc A, Taviano MF. Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. J Agric Food Chem 2009; 57: 6570-7.
- Miceli N, Trovato A, Marino A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De Pasquale R, Taviano MF. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. Food Chem Toxicol 2011; 49: 2600-8.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal plants and aromatic plant extract. Food Chem 2004; 85: 231-7.
- Oyaizu M. Study on products of Browning reactions prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 1986; 44: 307-15.
- Ozturk M, Tumen I, Ugur A, Aydogmus-Ozturk F, Topcu G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. J Sci Food Agric 2011; 91(5): 867-76.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. J Agr Food Chem 1992; 40: 945-8.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16: 144-58.
- Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De Pasquale R, Miceli N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. Food Chem Toxicol 2013; 58: 22-9.
- Tumen I, Hafizoglu H. Türkiye'de yetişen Ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin kozalak ve yaprak uçucu yağlarının bileşiminde bulunan terpen grupları. Bartın Orm Fak Derg 2003; 5(5): 88-95.
- Wang JL, Jiao LR. Successful treatment of a case of severe electrical burns with heart and lung injuries. J Burn Care Res 2000; 28: 762-5.



Kayseri İli Yahyalı İlçesi Süt Sığırcılık İşletmelerinde Suni Tohumlama Uygulamaları ve Başarıyı Etkileyen Faktörler

Hacı YILMAZ¹, Serpil SARIÖZKAN²

¹İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Serpil SARIÖZKAN; E-posta: serpilsariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5224-2341

Atıf yapmak için: Yılmaz H, Sarıözkan S. Kayseri ili Yahyalı ilçesi süt sığırcılık işletmelerinde suni tohumlama uygulamaları ve başarıyı etkileyen faktörler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 95-102.

Özet: Bu çalışmada Kayseri İli Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne üye süt sığırcılık işletmelerinde yapılan suni tohumlama uygulamaları, bu uygulamaların başarısı, suni tohumlama uygulamaları sırasında karşılaşılan problemler ve bunlara ait çözüm önerilerinin getirilmesi amaçlandı. Bu çalışma, Kayseri ili Yahyalı ilçesi Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine üye 16 süt sığırcılık işletmesinde yürütüldü. Araştırma materyalini, yetiştiricilerden yüz yüze anket yoluyla elde edilen veriler oluşturmuştur. Çalışmada 16 süt sığırcılık işletmesi; ilkinde buzağılama yaşı (hedef değer; ≤ 25 ay), buzağılama aralığı (hedef değer; < 400 gün), gebelik başına düşen tohumlama sayısı (hedef değer; ≤ 1.65) ve servis periyodu (hedef değer; ≤ 100 gün), gibi bazı fertilité parametreleri yönüyle değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde, anket uygulanan 16 işletmeden sadece 3'ü (% 18.75) hedeflenen fertilité parametrelerinin tümünü sağladıklarından dolayı etkin kabul edilmiş, diğer 13 işletmenin (% 81.25) ise etkin olmadığı saptanmıştır. Çalışmada, etkin olan 3 işletmenin buzağılama aralığı, gebelik başına tohumlama sayısı, servis periyodu ve ilkinde buzağılama yaşı sırasıyla 369.9 ± 25.2 gün, 1.3 ± 0.2 adet, 82.9 ± 25.8 gün, 24.3 ± 1.2 ay olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak; döl verimi parametrelerindeki hedeflenen değerler göz önüne alındığında sadece 3 işletmenin tüm hedef parametreleri sağladığı dolayısıyla etkin işletme sayısının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle, döl veriminde sürekliliğin sağlanmasında oldukça önemli bir rolü olan suni tohumlama tekniğinin uygulanmasında titiz davranılması ve başarıyı olumsuz yönde etkileyen faktörler konusunda üreticilerin eğitilmelerinin işletmelerin başarısına ve karlılığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Buzağılama aralığı, gebelik başına düşen tohumlama sayısı, ilkinde buzağılama yaşı, servis periyodu, suni tohumlama

Artificial Insemination Applications and the Factors Affecting Its Success in Dairy Cattle Enterprises in Yahyalı District of Kayseri Province

Summary: Aimed in this study are the artificial insemination practices in dairy herds (enterprises) of Dairy Breeding Association members in Kayseri province Yahyalı District, the success of these practices, the problems encountered during artificial insemination applications, and suggesting solutions to these problems. This study was performed in 16 dairy herds of Kayseri province Yahyalı District Dairy Breeding Association members. The data for this study was obtained through face to face questionnaires, administered to producers. In this study, 16 dairy enterprises were evaluated for some fertility parameters such as age at first calving (target value; ≤ 25 months), calving interval (target value; < 400 days), the number of insemination per conception (target value; ≤ 1.65) and service period (target value; ≤ 100 days). As a result of the evaluated data, it was found that only 3 (18.75 %) of the 16 enterprises to which questionnaires were applied were accepted as effective because they provided all the targeted fertility parameters, and the other 13 enterprises (81.75 %) were not effective. In this study, calving interval, the number of insemination per conception, service period and the age at first calving in 3 effective enterprises were calculated as 369.9 ± 25.2 days, 1.3 ± 0.2 straws, 82.9 ± 25.8 days, 24.3 ± 1.2 month, respectively. In conclusion; if we consider the targeted values in the fertility parameters, it is seen that only 3 enterprises provide all target parameters, and thus the number of effective enterprises is quite low. For this reason, it is thought that it will contribute to the success and profitability of the enterprises to be meticulous in the application of artificial insemination technique, which has a very important role in ensuring the continuity of fertilization, and to train the producers about the factors affecting the success negatively.

Key words: Age at first calving, artificial insemination, calving interval, service period, the number of insemination per conception

Giriş

Hızla artış gösteren dünya nüfusu, bilim adamlarını yaşamın devamlılığı için var olan kaynaklardan daha verimli yararlanma imkânlarını araştırmaya yöneltmiştir. Bu kapsamda üreme teknolojileri ve hayvancılık

sektöründe oldukça önemli olan reproduksiyon biyoteknolojileri geliştirilmiştir. Bu biyoteknikler içerisinde sığırlarda genetik ilerlemeyi sağlayan ve sahada etkin ve yaygın kullanılan suni tohumlama (ST) yöntemidir (Anonim 3, 2016; Nur, 2013). Türkiye'de ST çalışmaları ilk olarak Cumhuriyet döneminde 1926 yılında Rusya'dan gelen bir Veteriner Hekimin Karacabey harasında eğitim vermesiyle başlamıştır. Bu

Geliş Tarihi/Submission Date : 30.05.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.11.2019

*Bu çalışma aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

yönüyle ST biyotekniğini Rusya'dan sonra uygulayan ikinci ülke Türkiye olmuş ve günümüze kadar etkin bir şekilde kullanılmıştır (Sarıözkan ve ark., 2012). Suni tohumlama uygulamalarının artmasında Tarım ve Orman Bakanlığının anaç sığır ile ST'den doğmuş buzağılara destekleme ödemesi gerçekleştirmesinin etkin rolü bulunmaktadır (Anonim 2, 2015; Anonim 4, 2016). Süt sığırı yetiştiriciliğinde istenilen verim özelliklerinin ve sürünün devamlılığının sağlanması etkin bir sürü yönetimine bağlıdır (Uygur, 2004). Başarılı ve etkin kurulmuş olan sürü yönetimi sürdürülebilir süt verimi, döl verimi ve karlılık getirmektedir. İşletmede döl veriminin fizyolojik ve ekonomik sınırlar içinde devamlılığının sağlanabilmesi bazı fertilité parametrelerinin gerekli süre ve değerlerde elde edilmesine bağlıdır. Bu fertilité parametreleri ilkinde buzağılama yaşı (İBY), buzağılama aralığı (BA), doğum-ilk östrus aralığı, ilk tohumlamada gebe kalma oranı, buzağılamagebelik aralığı, toplam gebelik oranı ve suni tohumlama (gebelik) endeksidir. İlkinde buzağılama yaşı; ineklerin ilk defa buzağıladığı yaşı ifade etmektedir. Dolayısıyla düvenin ilk defa damızlıkta kullanıldığı, tohumlandığı yaşına bağlı olmaktadır. Düvelerin damızlıkta ilk kullanıma yaşları, gelişimlerinde, yaşamları boyunca verim kapasitelerinde ve kondüsyonlarında bir gerilemeye yol açmayan en erken yaş olarak kabul edilmektedir (Uygur, 2004). Düvenin ilk tohumlandığı yaşı ve vücut ağırlığı oldukça önemlidir. Bu durum, hayvanların verimliliği ve doğumlarının sorunsuz bir şekilde yapılabilirliği ile doğrudan ilgilidir. Sütçü sürülerdeki düvelerin arzu edilen ilk tohumlamadaki vücut ağırlığına yaklaşık 15 aylıkken erişmeleri, İBY'nin 24 ayda olmasını sağlamada önemlidir (Bearden ve Fuquay, 2000). Buzağılama aralığı, birbirini takip eden iki doğum arasındaki süreyi ifade etmektedir. Fertilité parametreleri açısından maksimum döl verimi oranlarına ulaşılabilmesi amacıyla iki buzağılama arası sürenin 365 gün olması hedeflenmelidir. Bununla birlikte yüksek süt veren ırklarda bu sürenin ekonomik toleransının 400 gün olması kabul edilebilmektedir (Alaçam, 2010; Uygur, 2004). Servis periyodu, ineğin buzağıladığı tarihten tekrar gebeliğin şekillendiği tarihe kadar geçen süreyi ifade etmektedir. Bu süre içerisinde geçen gün sayısı "açık gün sayısı" olarak da bilinir. Yılda bir buzağı alınabilmesi amacıyla gebelik süresi (280 gün) dikkate alındığında, ineğin doğum sonrası tekrar gebe bırakılması için SP olarak 85-90 günlük bir süre kalmaktadır, ekonomik tolerans süresi olarak 100 gün olarak kabul edilebilmektedir (Alaçam, 2010; Uygur, 2004). Gebelik başına düşen tohumlama sayısı, sürüde bir gebeliğin oluşması için yapılan tohumlama sayısını ifade etmektedir. Sürü içerisinde klinik olarak gebelik teşhisi konulan ineklerin gebeliği için kaç kez tohumlandığını gösterir sayısal bir değerdir (Alaçam, 1994). Süt sığırcılık işletmelerinde fertilité problemlerinin tümü sonuçta İBY ve BA'da uzama, fertilité kaynaklı reforme oranı ve GBTS'de artışa neden olduğundan bu kıstaslar genelde "fertilité parametreleri" olarak dikkate alınmak-

tadır (Sarıözkan ve ark., 2012). Ülkemizde, E-İslah sisteminden alınan, 2016 yılı Eylül ayında güncellenmiş, verilere göre ön soy kütüğüne (yetiştirme kayıtlarının olduğu sistem) kayıtlı 3 603 171, soy kütüğüne (yetiştirme ve verim kayıtlarının olduğu sistem) kayıtlı 3 478 578 baş olmak üzere, toplamda 7 081 749 baş dişi hayvan sayımız bulunmaktadır (Anonim 1, 2011; Anonim 7, 2016). Güncellenmiş verilere göre 2016 yılı Eylül ayında (23 Aralık 2016 tarihli HAYGEM verilerinden alınmıştır), 2002 yılından 2016 yılı Eylül ayına kadar yapılan ST sayıları incelendiğinde; 2002 yılından (2002 yılı tohumlama sayısı: 624 84) 2015 yılına kadar ST sayılarında (2015 yılı tohumlama sayısı: 4 144 225) ciddi bir artış olduğu görülmektedir. Suni tohumlama sayılarının yükselişinde resmi ekip çalışmalarına ilave olarak Tarım ve Orman Bakanlığının özellikle 2005, 2006, 2007 yıllarında, serbest veteriner hekimlere suni tohumlama teşviki vermesiyle birlikte serbest veteriner hekimlerin özveri ile çalışmaları yatmaktadır (Anonim 5, 2016).

Bu çalışmanın yapıldığı Kayseri ili, tarım alanları, çayır ve mera alanlarının fazlalığı yönüyle hayvancılık başta olmak üzere büyük bir tarım kenti niteliği taşımaktadır bu durum da hayvan varlığının artmasına sebep olmaktadır (Anonim 6, 2016). E-İslah sisteminden alınan 26.12.2016 tarihli verilere göre ön soy kütüğüne kayıtlı 111 056 baş ve soy kütüğüne kayıtlı 70 868 baş olmak üzere toplam 181 924 baş büyükbaş hayvan vardır (Anonim 8, 2017). Kayseri ilinde, 2006 yılından 2016 yılına kadar, 10 yıllık süre içerisinde, E-İslah kayıtlarına yansıyan toplam 497743 adet ST uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yapılan ST sayılarının 2016 yılına kadar artış gösterdiği ancak 2016 yılında tohumlama sayısında bir gerileme olduğu görülmektedir. Bu uygulamalarda İl/İlçe Müdürlüklerimiz resmi ekiplerinin yanı sıra serbest veteriner hekimlerin oldukça büyük katkısı olmuştur. Ancak, yetiştiricilerin boğa ile çiftleştirmeyi tercih etmeleri, hayvancılık destekleme mevzuatında yapılan değişiklikler suni tohumlama sayılarının azalmasına yol açmıştır. Yahyalı ilçesinde 2010 yılından 2016 yılına kadar 7 yıllık süre içerisinde, E-İslah kayıtlarına yansıyan toplam 15 331 adet ST uygulaması gerçekleştirilmiştir (Anonim 8, 2017).

Bu çalışmada, Kayseri ili Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı süt sığırcılık işletmelerinde yapılan ST uygulamaları temel alınan fertilité parametreleri yönünden değerlendirilmiş, işletmelerde uygulanan döl verimi programlarının başarısı, ST uygulamaları sırasında karşılaşılan problemler ve bunlara çözüm önerilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı 16 işletmeyle yüz yüze anket çalışması yapılmış ve bu işletmelerin fertilité parametrelerinden, buzağılama aralığı, ilkinde buzağılama yaşı, gebelik başına düşen tohumlama sayısı ve servis periyodu verilerine dair hesaplamalar yapılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarına göre benzeri bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, Kay-

seri ili Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı süt sığırcılık işletmelerinde yürütülen bu çalışmanın sonucu ülkemiz için bu alanda bir model teşkil edebilecektir.

durumları Tablo 1'de gösterildi. Bu tabloya göre, Yahyalı ilçesindeki soy kütüğüne kayıtlı süt sığırcılığı işletmelerinden, 16 işletmenin etkinlik/başarı durum-

Tablo 1. Tüm işletmelerinin etkinlik/başarı durumları

Etkinlik Durumu	Etkin Olan (n=3)	Etkin Olmayan (n=13)	P değeri
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
İşletme yaşı (Yıl)	14.7±2.3	14.2±1.2	0.855
Boğa altı hayvan sayısı (Baş)	14.3±3.8	43.2±13.4	0.331
Yıllık suni tohumlama yapılan hayvan sayısı (Baş)	13.3±4.5	23.6±5.8	0.423
Yıllık suni tohumlama ücreti (TL)	1 053.3±337.9	1 950.0±471.1	0.393
Yıllık doğan buzağı sayısı (Baş)	12.0±4.4	21.4±5.3	0.431
Buzağı ölüm oranı (%)	3.3±3.3	6.1±1.6	0.462
Süt verimi yıllık (Lt)	5 448.5±688.4	5 586.9±274.8	0.836
İnek başına alınan buzağı sayısı (Baş)	8.7±0.3	7.2±0.4	0.154

Gereç ve Yöntem

Çalışma, 01.02.2017-01.05.2017 tarihleri arasında araştırma bölgesi olarak seçilen Kayseri ili Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı olan 16 süt sığırcılık işletmesinin tamamında yürütüldü. Bu işletmeler damızlık birliğinin asil üyesi olup boğa altı inek sayıları (kültür ırkı ya da kültür melezi) en az 5-200 baş arasında değişmektedir. Verileri toplamak amacıyla; belirtilen süt sığırcılık işletmelerinde işletme sahipleri/ilgili kişilerle yüz yüze görüşülerek anket uygulandı. Çalışmanın ana materyalini anket yoluyla elde edilen veriler oluşturdu. Bunun yanında ikincil veriler olarak, il ve ilçe Tarım ve Orman Müdürlüklerinin resmi kayıtlarından, E-İslah Sisteminden, Türkvat Kayıt Sisteminden ve TÜİK verilerinden de yararlanılmıştır. Yahyalı ilçesi damızlık sığır işletmesine kayıtlı 16 işletme fertilitite parametrelerinden BA, SP, İBY ve GBTS değerleri, temel döl verimi ölçütü olarak ele alınmış ve bu ölçütlerin hedef değerleri olarak BA <400 gün, SP ≤100 gün, GBTS ≤1.65 ve İBY ≤25 ay kabul edilmiştir (Alaçam, 2010; Bearden ve Fuquay, 2000). Temel alınan fertilitite parametrelerinde (BA, SP, İBY ve GBTS) ve belirlenen bu parametrelerde hedef alınan ve yukarıda belirtilen değerlerin tümünü sağlayan işletmeler etkin/başarılı olarak sağlamayan işletmeler ise etkin/başarılı olmayan işletmeler olarak kaydedilmiştir. İşletmeler arası etkinlik karşılaştırılmasında bağımsız T-Test kullanılmıştır. Bu işletmelere ait verilerin tanımlayıcı istatistikleri (oran-yüzde-standart hata) yapılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Değişkenlerin etkinlik durumuna göre ortalama±standart

hataları ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) ve oransal dağılımları hesaplanmıştır.

Bulgular

Kayseri ili Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı 16 işletmede yapılan anket çalışmasında işletme sahiplerine yöneltilen soruların cevapları değerlendirildiğinde; işletmelerin kimi özellikleri yönüyle etkinlik/başarı

ları özetlendi. Etkin işletmelerin işletme yaşı, 14.7±2.3 yıl, boğa altı hayvan sayısı, 14.3±3.8 baş, yıllık ST yapılan hayvan sayısı, 13.3±4.5 baş, yıllık ödenen ST ücreti, 1 053.3±337.9 TL, yıllık doğan buzağı sayısı, 12.0±4.4 baş, buzağı ölüm oranı, 3.3±3.3, yıllık süt verimi, 5 448.5±688.4 Lt ve inek başına alınan buzağı sayısı, 8.7±0.3 baş olarak hesaplandı. Etkin olmayan işletmelerin işletme yaşı, 14.2±1.2 yıl, boğa altı hayvan sayısı, 43.2±13.4 baş, yıllık ST yapılan hayvan sayısı, 23.6±5.8 baş, yıllık ödenen ST ücreti, 1 950.0±471.1 TL, yıllık doğan buzağı sayısı, 21.4±5.3 baş, buzağı ölüm oranı, 6.1±1.6, yıllık süt verimi, 5 586.9±274.8 Lt ve inek başına alınan buzağı sayısı, 7.2±0.4 baş olarak hesaplandı. İncelenen parametreler yönünden gruplar arasında istatistiki bir fark görülmemiştir (P>0.05).

Anket yapılan işletmelere ait BA, GBTS, SP, İBY verileri Tablo 2'de gösterildi. Tabloda, etkin olan işletmelerin etkinlik/başarı durumu (*) ile etkin olmayan işletmelerin etkinlik/başarı durumu ise (-) ile gösterildi. Buzağılama aralığı, yapılan analizle <400 günden az olarak kabul edildi. İşletmelerden 4'ünün BA, 352 gün, 359 gün, 365.3 gün, 398.7 gün olarak hesaplandı. Diğer 12 işletmenin BA ise 400 günden fazla bulundu. Anket yapılan 16 işletmede, GBTS ≤1.65 kabul edildiğinde; etkin kabul edilen işletmelerde (toplam 7): 1 işletmede bu değer 1.2, 3 işletmede 1.3, 2 işletmede 1.4, 1 işletmede ise 1.5 olarak tespit edilmiştir. Anket yapılan süt sığırcılık işletmelerinde, SP ≤100 gün olarak kabul edildiğinde, etkin kabul edilen işletmelerde (toplam 4): 1 işletmede SP'nin 72 gün, 1 işletmede 79 gün, 1 işletmede 85.3 gün, 1 işletmede ise 97.8 gün olduğu analiz edilmiştir. Yapılan analizle İBY ≤25 ay olarak kabul edilmiş, İBY hesaplandığında, etkin kabul edilen işletmelerde (toplam 12): 9 işletmenin İBY 24 ay, 3 işletmenin 25 ay olduğu görülmüştür.

Yahyalı İlçesindeki soy kütüğüne kayıtlı süt sığırcılığı işletmelerinden, 16 işletmenin etkinlik/başarı durum-

Tablo 2. İşletmelerde döl verimi parametrelerinin analizi

İşletme No	Boğa Altı Hayvan Sayısı	Buzağılama Aralığı(Gün)	Etkinlik Başarı Durumu	Tohumlama Sayısı (Adet)	Etkinlik Başarı Durumu	Servis Periyodu (Gün)	Etkinlik Başarı Durumu	İlkine Buzağılama Yaşı (Ay)	Etkinlik Başarı Durumu
1	14	398.7	*	1.3	*	97.8	*	24	*
2	7	365.3	*	2.6	-	85.3	*	24	*
3	25	438.2	-	1.8	-	158.2	-	26	-
4	135	528.9	-	2.4	-	248.9	-	28	-
5	25	507.0	-	1.4	*	227.0	-	24	*
6	5	479.0	-	1.3	*	199.1	-	24	*
7	15	422.4	-	1.7	-	142.4	-	28	-
8	12	458.9	-	2.5	-	178.9	-	24	*
9	13	352.0	*	1.5	*	72.0	*	24	*
10	7	440.0	-	2.0	-	137.8	-	24	*
11	44	447.0	-	1.4	*	155.6	-	25	*
12	55	423.0	-	1.7	-	137.9	-	24	*
13	30	359.0	*	1.2	*	79.0	*	25	*
14	8	437.0	-	1.9	-	102.9	-	30	-
15	24	465.0	-	1.3	*	184.6	-	25	*
16	37	494.2	-	1.7	-	214.2	-	24	*
Genel Ortalama	456	438.5		1.7		151.3		25.2	

*:Etkin işletmeler

-:Etkin olmayan işletmeler

ları analiz edilmiş, hedef alınan tüm parametreler yönünden değerlendirildiğinde; 16 işletmeden, 3 işletmenin etkin, kalan 13 işletmenin ise etkin olmadığı görülmüştür. Etkin kabul edilen 3 işletmenin temel alınan fertilité parametrelerinin (BA, GBTS, SP ve İBY) tümünü sağladığı, diğer 13 işletmenin ise tümünü sağlamadığı saptanmıştır. Etkin olan ve olmayan işletmelerin temel alınan fertilité parametrelerine ait değerleri Tablo 3'da gösterilmiştir.

2-Etkin işletmelerde hayvanların kızgınlık takipleri işletme sahiplerince yapılmaktadır.

3-Etkin olan işletmelerdeki hayvanlar, kızgınlıklarının tespit edilmesinden 6-10 saat sonra tohumlanmaktadır.

4-Etkin işletmelerde genel olarak senkronizasyon yapılmakta, PGF2 α hormonu kullanılarak senkronizasyon uygulanmaktadır.

Tablo 3. Etkin ve etkin olmayan işletmeler

Etkinlik Durumu	İşletme Sayısı	Buzağılama Aralığı (Gün) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Gebelik Başına Tohumlama Sayısı (Adet) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Servis Periyodu (Gün) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	İlkine Buzağılama Yaşı (Ay) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
Etkinlik/Başarı Hedef kriterleri		<400	≤ 1.65	≤ 100	≤ 25
Etkin/Başarılı	3	369.9 \pm 25.2	1.3 \pm 0.2	82.9 \pm 25.8	24.3 \pm 1.2
Etkin/Başarılı Değil	13	454.3 \pm 1.2	1.8 \pm 0.5	167.1 \pm 47.7	25.4 \pm 2.0

Yapılan anket çalışması verilerinin değerlendirilmesi sonucunda; etkin olan işletmelerde ortak olan özellikler tespit edilmiş olup bunlar aşağıda özetlenmiştir. Buna göre;

1-Etkin işletme tiplerinin yarı açık olduğu görülmektedir.

5-Etkin işletmelerin hayvan ırklarının ağırlıklı olarak holstein ırkı ve melezlerinden oluştuğu görülmektedir.

6-Etkin işletmelerin, hayvanlarına ST yaptırırken, hayvanlarının kızgın olmalarının yanında, sağlıklı ve kimlik bilgilerinin doğru olmasını önemsedikleri görülmektedir.

7-Etkin olan bu işletmelerde ineklerinin yaşamları boyunca 8-9 buzağı verdiği analiz sonuçlarıyla tespit edilmiştir.

8-Etkin olan işletmelerdeki fertilitite parametreleri analiz edildiğinde BA'nın ortalama 369.9±25.2 gün olduğu tespit edilmiştir.

9-Yapılan analizle etkin işletmelerde GBTS'nin ortalama 1.3±0.2 adet olduğu anlaşılmıştır.

10-Etkin işletmelerde SP süresinin ortalama 82.9±25.8 gün olduğu saptanmıştır.

11- Etkin işletmelerde İBY 24.3±1.2 ay olarak tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Süt sığırcılığı işletmelerinde, sürü yönetiminde ve döl veriminin kontrolü mekanizmasında oluşabilecek aksaklıklar işletmelere maddi zarar olarak geri dönmektedir. Sürü yönetimi son yıllarda oldukça gelişmiş bir faaliyet alanı olup, sürüde yapılan bakım-besleme-sağlık kontrolleri ve verim analizleri gibi tüm işlemlerin bireysel değil sürü temelli olmasını sağlamaktadır (Ondersteijn ve ark., 2003). Süt üretimi, buzağı doğumları ve gelişen laktasyon periyodu üzerine kurulu bir sistemdir. Sürüde oluşabilecek bir reproduktif problem dölverimini doğrudan ilgilendirecektir. Bu nedenle sürü yönetimi programlarının işletmelerde çok sağlam bir şekilde kurulması ve takip mekanizmasının oluşturulması gerekmektedir (Korkmaz ve Ağaoğlu, 2012). Yapılan bir araştırmada, Kayseri ili damızlık sığır yetiştiricileri birliğine üye 196 işletmedeki Holstein ırkı 1705 baş ineğe ait toplam 3814 laktasyon kayıtları, İBY, BA ve GBTS yönüyle incelenmiş ve bu fertilitite parametrelerinin hedef değerlerden sapması halinde meydana gelebilecek mali kayıplar hesaplanmıştır. Aynı araştırmada, ortalama İBY 821 gün, BA 403 gün ve GBTS ise 1.8 adet olarak hesap edilmiştir. Sonuç olarak, İBY, BA ve GBTS'de hedef değerlerden sapma nedeniyle oluşan toplam mali kayıp 3 345 092 TL (2 230061 US\$) olduğu bildirilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışma sonuçlarına göre; süt sığırcılığı işletmelerinde döl veriminde oluşan düzensizliklerin neticesinde görülen maddi kayıpların önemsenecek rakamlara ulaştığı ve bu nedenle hayvan sahiplerine süt sığırcılığı yetiştiriciliğinde döl veriminin önemi üzerine eğitimlerin verilmesi oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır (Erdem, 2007).

Yaptığımız tez çalışmasında, Kayseri ili Yahyalı ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı 16 işletmeyle yüz yüze anket çalışması yapılmış ve bu işletmelerin, fertilitite parametrelerinden, BA'ları, İBY'leri, GBTS'leri ve SP'lerine dair hesaplamalar yapılmıştır. Belirtilen fertilitite parametrelerinin analizleri sonucunda, anket çalışması yapılan 16 işletmeden, 3 işletmenin etkin, kalan 13 işletmenin ise etkin olmadığı saptanmıştır.

Süt sığırcılığı işletmelerinde karlılığı sağlayan temel unsur döl verimidir. Karlılığın yüksek olması amacıyla döl veriminde fertilitite parametreleri için ortalama hedef değerler önceden belirlenmiş olup, uygulamada bu değerlere ulaşılması gerekmektedir. Ancak, döl verim kalitesinin şekillenmesinde hayvanın genetik yapısının etkisi daha az olduğundan, sürdürülebilir bir döl verimi için çevre şartlarının düzenlenmesi oldukça önemlidir (Erdem, 2007). Yapılan bir çalışmada 5 adet süt sığırcılığı işletmesindeki ineklere ait 7 748 laktasyon kaydı sonucunda İBY, BA ve GBTS için kabul edilebilir hedef değerlerden (24 ay, 12 ay ve 1.7 adet) sapmaların sırasıyla ortalama 4.1-6.3 ay, 1.6-2.7 ay ve 0.10-0.41 adet arasında değiştiği bildirilmiştir (Kumuk ve ark., 1999). Yaptığımız çalışmada Yahyalı ilçesindeki soy kütüğüne kayıtlı 16 işletmeyle yapılan anket çalışması sonucunda etkin olan 3 işletmenin çalışmada esas alınan fertilitite parametrelerinde hedef değerleri İBY'nin ortalama 24.3±1.2 ay, BA'nın 369.9±25.2 gün ve GBTS'nin 1.3±0.2 olması yönüyle sağladığı tespit edilmiştir. Bu değerler yönüyle Kumuk ve ark.'nın (1999), 5 ayrı süt sığırcılığı işletmesinde, yukarıda belirtilen fertilitite parametrelerinden hedef değerlerinden sapması yönüyle çalışmamızda değerlendirilen 3 etkin işletmenin ise hedef değerler içinde olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmamızda etkin olmayan 13 işletmenin İBY'nin ortalama 25.4±2.0 ay, BA'nın 454.3±45.6 gün ve GBTS'nin 1.8±0.5 olması yönüyle Kumuk ve ark.'nın (1999) yaptıkları çalışmadaki işletmeler gibi hedef değerlerden saptıkları tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada etkin olan işletmelerdeki fertilitite parametreleri analiz edildiğinde BA'nın ortalama 369.9±25.2 gün olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değer, İnci ve ark.'nın (2007), Altınova Tarım İşletmesinde yetiştirilen 324 baş Esmer sığırların süt ve döl verim özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada tespit ettikleri 383.1±4.7 günlük BA ile Akman ve ark.'nın (2001), Gelemen Tarım İşletmesinde yetiştirilen ve 1982-1997 yılları arasında buzağılayan 750 baş Siyah-Alaca inek üzerinde yaptıkları çalışmadan elde ettikleri BA olan 388.5±3.39 gün değerine yaklaşık bir değer olduğu ve belirtilen çalışmalardaki değerlerin çalışmamızdaki BA'daki hedef değer (<400) içerisinde olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda etkin olan işletmelerde saptanan BA değerinin belirlenen hedef değerler içerisinde olması, etkin işletmelerin hayvanlarının kızgınlık takiplerini başarıyla yaptıklarını ve hedef SP süreleri içerisinde hayvanlarına ST yaptıklarını göstermektedir. Çalışmamızda yapılan analizle etkin işletmelerin GBTS'nin 1.3±0.2 olduğu saptanmıştır. Saptanan bu değer, Kumuk ve ark.'nın (1999), beş farklı kamu çiftliğinde yetiştirilen Siyah Alaca sığırlarda yaptıkları çalışmada buldukları, GBTS olan, 1.80 ile 2.11'den düşük bulunmuştur. Bu farklılık, Kumuk ve ark.'nın (1999) çalışmalarını 1973-1987 yılları arasında yapmalarına ve zaman ilerledikçe üreticilerin daha da bilinçlendiğine bağlanmaktadır. Çalışmamızda analiz sonuçlarıyla belirlenen etkin

işletmelerdeki SP 82.9 ± 25.8 gün olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değer, Erdem ve ark.'nın (2007), Amasya ili Gökhöyük Tarım İşletmesinde 1996–2002 yılları arasında yetiştirilen 179 baş Siyah Alaca inek üzerinde yaptıkları araştırmada buldukları 122.4 ± 6.0 günlük SP değerinden ve İnci ve ark.'nın (2007), Altınova Tarım İşletmesinde yetiştirilen 324 baş Esmer sığırların süt ve döl verim özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada tespit ettikleri 99.5 ± 5.0 gün olan SP değerinden düşük bulunmuştur. Bulunan bu değer ile çalışmamızdaki etkin işletmelerin sahip oldukları ineklerin doğum sonrası süreçlerini sıkı takip ettiklerini, hayvanların üreme organlarında involüsyon sürecinin sağlıklı bir şekilde tamamlandığını, doğum sonrası kızgınlık takibinin başarıyla yapıldığı ve SP için bilinen hedef süre içerisinde ineklerinin yeniden tohumlandığı anlaşılmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda etkin işletmelerde İBY'nin 24.3 ± 1.2 ay olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu değer, Şahin ve Ulutaş'ın (2010), Polatlı Tarım İşletmesinde yetiştirilen Siyah Alaca inekler üzerinde yaptıkları araştırmada buldukları İBY olan 823.9 ± 6.07 gün değerinden düşük olduğu, görülmüştür. Yaptığımız çalışmada analiz sonuçlarına göre fertilitite parametrelerinden hedef değerlerin tümünü sağlaması nedeniyle etkin kabul edilen 3 işletmede de ortak özelliklerden birinin işletme tiplerinin yarı açık olmasıdır. Bu tip barınaklarda hayvanların sürekli temiz havaya maruz kalmaları ve sürekli hareket edebilme olanaklarının olması yemden yararlanmalarının artmasını, bağışıklık sistemlerinin gelişmesini, ayak hastalıklarına daha az yakalanmasını ve östrüs belirtilerinin gözle görülebilir olmasını sağlamaktadır (Gökçen, 2018). Dolayısıyla barınaklarının yarı açık ve açık olduğu işletmelerde hayvan refah koşullarının arttığı göz önüne alındığında çalışmamızda değerlendirilen 3 işletmeyi etkin kıldığı söylenebilmektedir. Yapılan çalışmada analiz sonuçlarına göre fertilitite parametrelerinden hedef değerlerin tümünü sağlaması nedeniyle etkin kabul edilen 3 işletmede ineklerin kızgınlık takiplerinin işletme sahiplerince yapıldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada analiz sonuçlarına göre fertilitite parametrelerinden hedef değerlerin tümünü sağlaması nedeniyle etkin kabul edilen 3 işletmedeki ineklerin kızgınlıklarının işletme sahiplerince tespit edilmesinden 6-10 saat sonra tohumlandığı saptanmıştır. Suni tohumlamanın doğru zamanda yapılması optimum gebelik oranı için oldukça önemlidir. Östrüs saptama ile ilgili problemler ineklerde östrüs sürelerinin kısa olması ve östrüs periyod uzunluklarının çok değişken olabilmesi nedenleriyle diğer türlere kıyasla oldukça kritik öneme sahiptir (Anderson, 1991; Bearden ve Fuquay, 2000; Hafez, 1987). Çalışmamızın analiz sonuçlarına göre fertilitite parametrelerinden hedef değerlerin tümünü sağlaması nedeniyle etkin kabul edilen 3 işletmenin ortak özelliklerinden birinin Veteriner Hekimlerinin uygun gördükleri protokol ile PGF2 α hormonu kullanılarak

senkronizasyon yaptırmak olduğu saptanmıştır. Ülkemizde iki ya da üç inekten oluşan aile işletmelerinden, çok başlı hayvan kapasitesine sahip işletmelere kadar reproduktif performansı etkileyen en önemli faktör kızgınlıkların doğru tespit edilememesi ve bu nedenle tohumlama zamanlarında yapılan hatalardır. Bu nedenle, ST işlemlerinin kontrollü ve planlı bir şekilde sürdürülmesi yoluyla fertilitite ve gebelik oranlarının yükseltilmesi sağlanmalıdır (Daşkın, 2005; Pekçok ve Aksu, 2015) Östrüs senkronizasyonu veya sığırlarda ovulasyonu başlatmayı hedefleyen işlemler, laktasyon dönemindeki sütçü ırk sığırlarda, kızgınlıkların tespitine gerek duyulmaksızın, zamanında ST uygulamasına imkân sağlamaktadır (Foote, 1975; Williamson ve ark., 1972). Çalışmanın anket sonuçlarına göre etkin kabul edilen 3 işletmenin hayvanlarına ST yaptıran, hayvanlarının kızgınlıkta olmalarının yanında sağlıklı ve kimlik bilgilerinin doğru olmasını da önemsedikleri görülmüştür. Hedeflenen döl verimlerine ulaşılabilmesi için öncelikli olarak kızgınlıklar tam olarak belirlenmeli, zamanında tohumlama uygulamaları yapılmalı ve işletmede tüm yapılan işlemlere dair kayıtların önem verilerek tutulması gerekmektedir (Stephen ve ark., 1998). Süt sığırı işletmelerinde verimlilik ve dolayısıyla kârlılığın artırılması için işletme sahiplerine güncel bilgilerin ve hayvancılık teknolojilerinin gösterilmesi ve hayvan sahiplerine düzenli olarak eğitim çalışması yapılması gerekmektedir (Kumuk ve ark., 1999). Çalışmamızda yapılan analiz sonuçlarıyla etkin kabul edilen 3 işletmedeki ineklerin yaşamları boyunca 8-9 buzağı verdiği yapılan analizle tespit edilmiştir. İşletmeler yönünden ekonomik açıdan sütçü ineklerin en az 5. laktasyondan sonra işletmeden çıkarılmaları önerilmektedir (Altunkaya, 1997). Başarıyı yakalamış bir süt sığırı işletmesinin süt ve döl verimlerinden memnun kaldığı sığırlardan en az 4–5 buzağı alması ve mecbur olmadıkça da 6–7 laktasyondan önce işletmeden göndermemesi, süt sığırı işletmelerinde sığırların damızlıkta kullanılma süresinin en az 7 yıl olması gerektiği bildirilmektedir (Lothammer ve Wittkowski, 1994).

Sonuç olarak, Dünyada üreme biyoteknolojisinin en eski ve en yaygın kullanılan tekniği ST'dir. Türkiye İstatistik Enstitüsü ile Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvancılık Genel Müdürlüğünden temin edilen resmi veriler incelendiğinde; 1997 yılında 728 bin baş sığır ST yoluyla tohumlanmışken, bu rakam 2017 yılında 4.5 kat artarak 3.2 milyon başa ulaşmıştır. Ayrıca, Türkiye'de 2017 yılında 5.9 milyon olan sağmal sığır varlığının 3.2 milyonuna ST yapıldığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu bilgiler ışığında ST'nin yaygınlaşmasına halen ihtiyaç olduğu ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan yapılan ST uygulamalarının sadece sayısal olarak artırılması değil başarı oranlarının da tezde de bahsedilen döl verimi parametreleri yönüyle takip ve kontrol edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede, mevcut hayvansal üretim ve verimliliğin artırılacağı düşünülmektedir. Bu yönüyle Kayseri ili Yahyalı

ilçesinde soy kütüğüne kayıtlı 16 işletmenin verileri bir "model" olarak değerlendirildiğinde ve teze esas alınan döl verimi parametrelerindeki hedeflenen değerler göz önüne alındığında sadece 3 işletmenin tüm parametreleri sağlanması ve etkin kabul edilmesi yönüyle etkin işletme sayısının oldukça düşük olduğu görülecektir. Bu nedenle, hayvansal üretimde sürekliliğin sağlanmasında bu denli önemli biyotekniğin uygulanmasında titiz davranılmalı, başarıyı olumsuz yönde etkileyen; kızgınlıkların yeterince tespit edilememesi, spermanın iyi muhafaza edilememesi, taşınmaması, hatalı çözdürülmesi ve uygulama hataları gibi faktörler en aza indirgenmelidir. Bu kapsamda sahada görev alan ST uygulayıcıları, birlik üyesi yetiştiricilere belirli aralıklarla ve ST uygulaması aşamalarında öncelikli olarak; ST uygulamalarının önemi ve kızgın hayvanların takibi, hayvanların bakım ve beslenmeleri, işletme koşulları, döl verimini etkileyen hastalıklar, işletmelerde kayıt tutulması, hayvancılık desteklemeleri konularında bilgilendirme çalışmaları yapılmalıdır.

Kaynaklar

- Akman N, Ulutaş Z, Efil H, Biçer S. Gelemen tarım işletmesinde yetiştirilen siyah-alaca sürülerinde süt ve döl verimi özellikleri. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg 2001; 32(2): 173-9.
- Alaşam E. İnekte infertilite sorunu. Alaşam E. eds. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. 7. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi 2010; ss. 267-90.
- Alaşam E. Üremenin denetlenmesi. Alaşam E. eds. In: Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama Doğum ve İnfertilite. 1. Baskı. Konya: Dizgi Evi, 1994: ss. 81-7.
- Altunkaya R. Damızlık Yetiştiriciliğinde Büyük Kaynak İsrافی. Türk Holstein Friesian Vet Derg 1997; 3 (10): 5.
- Anonim 1. Hayvanlarda Soy Kütüğü ve Ön Soy Kütüğü Esasları Hakkında Yönetmelik, T.C. Resmi Gazete, 05.Aralık 2011, Sayı: 28133.
- Anonim 2. Hayvancılık Desteklemeleri Hakkında Uygulama Esasları Tebliği, T.C. Resmi Gazete, 12.Mayıs 2015 Sayı: 29353.
- Anonim 3. Amasya Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği. Suni Tohumlama. <https://www.amasyadsyb.org/faaliyet/sunitoh>; Erişim tarihi: 23.12.2016.
- Anonim 4. Hayvancılık Desteklemeleri Hakkında Uygulama Esasları Tebliği, T.C. Resmi Gazete, 24.Haziran 2016 Sayı: 29752.
- Anonim 5. Hayvancılık Genel Müdürlüğü. <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM>; Erişim tarihi: 23.12.2016.
- Anonim 6. Kayseri Tarım ve Orman Müdürlüğü. <https://kayseri.tarimorman.gov.tr/Menu/79/Arazi-Durumu>; Erişim tarihi: 26.12.2016.
- Anonim 7. Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Hayvancilik/Buyukbas-Hayvancilik>; Erişim tarihi: 01.06. 2016.
- Anonim 8. Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği. <http://www.dsymb.org/vize.aspx?ReturnUrl=%2f>; Erişim tarihi: 21.01.2017.
- Anderson GB. Fertilization, early development, and embryo transfer. Cupps PT. eds. In: Reproduction in Domestic Animals, 4th. California: Academic press, 1991; pp. 279-313.
- Bearden HJ, Fuquay JW. Applied animal reproduction. Fifth edition. INC Upper Saddle River NJ USA: Prentice Hall, 2000; p.256.
- Daşkın A. Sığırcılık İşletmelerinde Reprodüksiyon Yönetimi ve Suni Tohumlama. Ankara: Aydan Web Ofset, 2005; ss. 5-28.
- Erdem H, Atasever S, Kul E. Gökhöyük tarım işletmesinde yetiştirilen siyah alaca sığırların süt verimi üzerine bazı döl verimi özelliklerinin İncelenmesi. OMÜ Ziraat Fak Derg 2007; 22(1): 47-54.
- Foot RH. Estrus detection and estrus detection aids. J Dairy Sci 1975; 58(2): 248-56.
- Gökçen H. <http://www.hazimgokcen.net/category/bilimsel/page/6>; Erişim tarihi: 05.11.2018.
- Hafez ESE. Transport and survival of gametes, Hafez ESE. eds. In: Reproduction in Farm Animals, 5th. Edition. Philadelphia: Lea-Febiger 1987; pp. 168-88.
- İnci S, Kaygısız A, Efe E, Baş S. Altınova tarım işletmesinde yetiştirilen esmer sığırların süt ve döl verim özellikleri. Ankara Üniv Ziraat Fak Tarım Bil Derg 2007; 13(3): 203-12.
- Korkmaz Ağaoğlu Ö, Ağaoğlu AR. Süt sığırı yetiştiriciliğinde doğum localarının önemi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2012; 9(1): 43-50.
- Kumuk T, Akbaş Y, Türkmüt L. Süt sığırcılığında döl verimine ilişkin ekonomik kayıplar ve yetiştiricilerin bilgi ve teknoloji ihtiyacı. Hayvansal Üretim 1999; 39 (40):1-12.
- Lothammer KH, Wittkowski G. Fruchtbarkeit und Gesundheit der Rinder. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer GmbH, 1994; pp. 60.
- Nur Z. Spermanın alınması ve muayenesi. Soylu MK. eds In: Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama. 2. Baskı. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Web-ofset tesisleri,

2013; ss. 21-34.

Ondersteijn CJM, Giesen GWJ, Huirne RBM. Identification of farmer characteristics and farm strategies explaining changes in environmental management and environmental and economic performance of dairy farms. *Agricultural Syst* 2003; 78(1): 3155-62.

Pekçok D, Aksu EH. Sığırlarda östrus senkronizasyonu ile birlikte kullanılan döl tutma oranını etkileyen faktörler. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg* 2015; 10(3): 205-10.

Sarıözkan S, Aral Y, Murat H, Erol A, Sarıözkan S. Süt sığırcılığı işletmelerinde fertilitte bozukluklarından kaynaklanan finansal kayıpların hesaplanması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2012; 59(1): 55-60.

Stephen JL, Leslie KE, Ceelen HJ, Kelton DF, Keefe GP. Measures of estrus detection and pregnancy in dairy cows after administration of gonadotropin releasing hormone within an estrus synchronization program based on prostaglandin F2 α . *J Dairy Sci* 1998; 81(2): 375-81.

Şahin A, Ulutaş Z. Polatlı tarım işletmesinde yetiştirilen siyah alaca ineklerde süt ve döl verimleri. *Anadolu Tarım Bilim Derg* 2010; 25(3): 202-12.

Uygur M. Süt sığırcılığı sürü yönetiminde döl verimi. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Hayvansal Üretim Dergisi* 2004; 45(2): 23-7.

Williamson NB, Morris RS, Blood DC. A study of oestrus behaviour and oestrus detection methods in a large commercial dairy herds. *Vet Rec* 1972; 91(3): 58-62.



Rabbit Liver Lobes: An Anatomical Study of Experimental Surgical Approaches

Figen SEVİL KILIMCI

Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Aydın-TÜRKİYE.

Corresponding author: Figen Sevil-Kilimci; E-mail: fsevil@adu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-2291-0545

Atıf yapmak için: Sevil Kilimci F. Rabbit liver lobes: an anatomical study of experimental surgical approaches. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(2); 103-108

Summary: A number of animal models have been developed for experimental liver surgery protocols such as lobectomy, ischemia and reperfusion studies, organ injuries, and drug trials. Though, some morphometric studies describe the liver lobes in rats and mice, such anatomical information is not sufficiently available in rabbits. The aim of this study was to evaluate the anatomical approaches for experimental liver resection in the rabbit, and to examine the proportional distribution of each lobe conforming to the whole organ, and to schematize the macroanatomical properties of each lobe. For this purpose, the liver lobes were dissected according to anatomical references. The volumes and weights of the whole organ and the individual lobes were measured. The percentages of the liver lobes were calculated according to the weight and volume of the total liver. The interlobar notch, especially between the medial and lateral parts of the left lobe was more prominent than that between the quadrate and the right lobe. The proportion of the left lateral and medial lobe was 27%, and 24% relative to the total liver weight, similarly, the right lobe, quadrate lobe and the caudate lobe was 19%, 7% and 23%, respectively. The volumetric ratios of liver lobes were also found close to the mass ratios. In conclusion, anatomical information from this study can be used as a reference in performing various experimental surgical studies on the rabbit liver.

Key words: Anatomy, liver, lobes, rabbit

Tavşan Karaciğer Lobları: Deneysel Cerrahi Yaklaşımlarına İlişkin Anatomik Bir Çalışma

Özet: Lobektomi, iskemi ve reperfüzyon çalışmaları, organ yaralanmaları, ilaç denemeleri gibi deneysel karaciğer cerrahisi protokolleri için farklı hayvan modelleri geliştirilmiştir. Rat ve farelerde karaciğer loblarını tanımlayan bazı morfo-metrik çalışmalar olmasına rağmen, bu anatomik bilgiler tavşanlarda yeterli değildir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı bir deney hayvan olan tavşanlarda karaciğer rezeksiyonuna anatomik yaklaşımı ve her bir lobun tüm organa göre dağılım oranlarını değerlendirmek ve makroanatomik şemayı oluşturmaktır. Bu amaçla karaciğerlerde loblar anatomik referanslara göre diseke edilmiştir. Tüm karaciğer ve daha sonra her bir lobun tek tek ağırlıkları ve hacimleri ölçülmüştür. Karaciğerin loblarının, total karaciğerin ağırlığına ve hacmine göre yüzde değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada karaciğer lobları arasında bulunan incisura interlobaris, özellikle sol lobun medial ve lateral bölümleri arasında çok belirgin olduğu ve aynı zamanda bu lobların birbirinden tamamen ayrı iki lob olarak görüldüğü dikkati çekti. Ayrıca toplam karaciğer ağırlığına göre, sol lateral lobun oranı yaklaşık % 27, sol medial lob % 24, sağ lob % 19, kuadrat lob % 7 ve kaudat lob % 23 olarak bulundu. Hacim ölçümlerine göre lob oranları, kütle oranlarına yakın değerlere sahip olduğu bulundu. Sonuç olarak bu çalışmada; deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere karaciğer rezeksiyonları başta olmak üzere çeşitli deneysel çalışmalarda operasyona referans olabilecek anatomik bilgi ile organın loblanmasının oransal verileri sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Anatomi, karaciğer, lob, tavşan

Introduction

In the liver, lobectomy is a surgical procedure that is required both in human and veterinary medicine for a variety of procedures such as tumor, trauma, and transplantation (Teh et al., 2007; Zhang et al., 2014; Tüzün et al., 2015). A good understanding of liver and lobes' volumes is not only important to estimate the vital functions of the body during lobectomy or transplants surgeries, but also during the functional remnant liver volume and the small size syndrome (Dahm et al., 2005; Tucker and Heaton, 2005). In

addition, proportional measurements of lobes are also essential in hepatic ischemia and reperfusion studies (Graaf et al., 2011; Van Den Esschert et al., 2012; Huisman et al., 2014; Olthof et al., 2017). Due to above-mentioned facts, the knowledge of the liver anatomy is necessary in experimental surgical studies such as hepatectomy (Rahman and Hodgson, 2000; Madrahimov et al., 2006; Aller et al., 2009a-b; Alheani and Al-Kennany, 2013; Nevzorova et al., 2015), liver regeneration (Palmer and Spiegel, 2004; Bélanger and Butterworth, 2005), embolism (Graaf et al., 2011; Van Den Esschert et al., 2012; Huisman et al., 2014; Olthof et al., 2017), and liver tumors (Qi et al., 2007; Zou et al., 2012). These studies have been frequently carried out on rats and mice (Rahman and

Geliş Tarihi/Submission Date : 22.10.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 10.03.2020

Hodgson, 2000; Palmes and Spiegel, 2004; Teh et al., 2007; Tuñón et al., 2009; Huisman et al., 2014; Torre et al., 2014; Zhang et al., 2014; Tedde et al., 2015) and only a few studies reported the proportions of liver lobes (Kubota et al., 1997; Martins et al., 2007). Given that the small size of these animals, as well as the variability of anatomical structures compared with humans, is considered to be a disadvantage for experimental surgical applications (Martins et al., 2007), rabbits may be preferred as anatomical model for these experimental surgical techniques, owing to the presence of gallbladder, larger volume than other rodents and closer functions to human liver (Olthof et al., 2017; Páramo et al., 2017).

In light of this information, the present study describes the macro-anatomical information and proportional distribution of organ lobes to support the research of experimental liver surgeries in rabbits.

Materials and Methods

This study was conducted with the permission of Animal Experiments Ethics Committee (HADYEK), 64583101/2018/125, Aydin Adnan Menderes University. Twenty New Zealand (*Oryctolagus Cuniculus*) female rabbit cadavers with a mean body weight of 2855.25 ± 680.05 grams were used. These animals had previously been used in the studies and no such application that could have affected the abdomen and the liver morphology. Macroscopically, organs with any suspected pathological formation were not used in the study.

The abdominal region was dissected in the cadavers used. After the resection of ligaments and vascular connections near the liver, organs were stored in the plastic boxes at 4°C in 10% formalin solution. Before the lobes were separated, the organs were immersed in distilled water for one hour, thereafter, the volume of the whole organs was measured by "The Archimedes principle". Immediately after, the organs were dried with the towel paper and the total weight was measured. According to the studies (Stan, 2018 and Stamatova-Yovcheva et al., 2012) each lobe of the liver was carefully separated and weighed with precision scales (Precisa, XB-1200C), and volumes were measured by the Archimedes principle.

The ratios of the weight and volume of the liver lobes to the total weight and volume values of the liver were calculated. The weight ratios of the liver lobes to the live body weights of the animals and, also the Pearson's correlations for weights and volumes were calculated. The mean values \pm SEM the proportional data were determined by the SPSS 19.00 (IBM/SPSS, Armonk, New York, United States).

Results

At the midventral incision, the liver was seen situated caudally to the diaphragm at the cranial abdominal region. It was observed that it passed over the lesser curvature of the stomach and found in close contact with the right kidney. The five lobes in the rabbit liver were presented as, the right lobe (RL), the left medial lobe (LML) and the left lateral lobe (LLL), the quadrate lobe (QL), the caudate lobe (CL), while the caudate lobe; the papillary process (PP) and the caudate process (CP) was again divided into two.

The interlobar notches were located between the liver lobes being more prominent, especially between the medial and lateral parts of the left lobe, and it was noted that these two subdivisions were seen as two completely separate lobes. Between the quadrate and the right lobe, the interlobar notch was less apparent. On the diaphragmatic surface of the liver, between the left medial lobe and the right lobe, a prominent structure of the falciform ligament was noted (along approximately 23-mm junction line) and extended to the portal region.

The papillary process of the caudate lobe was relatively round and located at the front aspect of the lesser curvature of the stomach, while the caudate process was cylindrical, and extended from the back of the curvature ventriculus minor to the right kidney.

The renal impression of the liver was markedly deep. It was also noted that there was a thin-long liver tissue (paracaval portion of the caudal lobe-CLparacaval) between the papillary process and caudate process at the level of the lesser curvature of the stomach. Some vessels such as the caudal vena cava, hepatic artery and portal vein were also visible in this region. The esophagus also passed closer to papillary process. It was seen that the gallbladder was embedded in the visceral surface of the right lobe and did not reach the ventral edge of the lobe.

The mean \pm SEM the percentage of weight and volume of liver lobes were presented in Table 1 and Figure 1-B. The weight ($TL_{Weight}\%$) and volume ($TL_{Volume}\%$) ratios of lobes relative to the total liver were similar (Table 1). It was noted that the largest lobe was left lateral lobe and the smallest lobe was the papillary process. While the sum of the left lobes measurements was approximately half of the total liver ($\sim 50\%$), the papillary process was found to constitute 5% of the total liver. It was also noted that one-fourth of the total liver was formed by the right lobe and the quadrate lobe. On the other hand, the left lobe and the right lobe together constituted $\sim 70\%$ of the liver. In addition, the volume of the paracaval portion was 3%. The correlations for weights and volumes were also presented in Table 2 and Table 3. The left lateral lobe weight showed positive high

correlation with the total liver weight (r=0.933) and the body weight (r=0.593). At the same time, the left lateral lobe volume showed positive high correlation with the total liver volume (r=0.892).

Lienden et al., 2011; Van Den Esschert et al., 2012; Huisman et al., 2014; Olthof et al., 2017; Páramo et al., 2017) in rabbit and some studies report five lobes (Stamatova-Yovcheva et al., 2012; Stamatova-

Table 1. Weight and volume percentage of liver lobes to total liver and body weight (N=20)

Lobes	BW% Mean±SEM	TL _{Weight} % Mean± SEM	TL _{volume} % Mean± SEM
LLL	0.67±0.04	27±0.083	29±1.02
LML	0.60±0.04	24±0.082	23±1.05
RL	0.48±0.03	19±0.62	17±0.67
QL	0.19±0.01	7±0.50	8±0.75
PC	0.40±0.04	16±0.83	15±1.04
CL _{paracaval}	0.08±0.01	3±0.23	3±0.27
PP	0.09±0.01	4±0.28	5±1.15
TLL	2.51±0.12	100	100

TLL: Total Liver lobes. BW%: Body weight percentage, TL_{Weight} %: Total liver weight percentage, TL_{volume} %: Total liver volume percentage LLL: Left lateral lobe of liver, LML: Left medial lobe of liver, RL: Right lobe QL: quadrate lobe, PP: papillary process. PC: caudate process, CL_{paracaval}: paracaval portion of caudal lobe.

Table 2. The Correlation table showing weight of body, total liver and individual liver lobes

	TLL	LLL	LML	PP	PC	CL _{paracaval}	QL	RL
BW	0.575**	0.593**	0.470*	0.260	0.163	0.569**	0.303	0.583**
TLL		0.933**	0.852**	0.596**	0.665**	0.640**	0.495*	0.858**
LLL			0.748**	0.531*	0.571*	0.675**	0.413	0.781**
LML				0.428	0.341	0.486*	0.428	0.758**
PP					0.455	0.454*	0.240	0.470*
PC						0.207	0.190	0.529*
CL _{paracaval}							0.540*	0.454*
QL								0.382
RL								1

*: P< 0.05; **: P< 0.01.

BW: Body weight, TLL: Total Liver lobes, LLL: Left lateral lobe of liver, LML: Left medial lobe of liver, RL: Right lobe QL: quadrate lobe, PP: papillary process. PC: caudate process, CL_{paracaval}: paracaval portion of caudal lobe.

Table 3. The Correlation table showing volume of whole liver and individual liver lobes

	LLL _v	LML _v	PP _v	PC _v	CL _{paracaval} V	QL _v	RL _v
TLL _v	0.892**	0.712**	0.161	0.695**	0.525*	0.518*	0.766**
LLL _v		0.465*	0.231	0.584**	0.410	0.469*	0.612**
LML _v			0.009	0.292	0.309	0.502*	0.613**
PP _v				-0.012	0.071	0.017	0.167
PC _v					0.313	0.115	0.569*
CL _{paracaval} V						0.038	0.462*
QL _v							0.195
RL _v							1

*:P< 0.05 ; **: P< 0.01

TLL_v: Total Liver lobes volume. LLL_v: Left lateral lobe of liver volume, LML_v: Left medial lobe of liver volume, RL_v: Right lobe volume QL_v: quadrate lobe volume, PP_v: papillary process volume. PC_v: caudate process volume, CL_{paracaval} V: paracaval portion of caudal lobe volume.

Discussion and Conclusion

In experimental lobectomy, it is important to distinguish each liver lobe term anatomically (Martins et al., 2007), but it is noteworthy that in various studies, there is confusion in using the terms for liver lobes. While various studies reported four liver lobes (Van

Yovcheva et al., 2018; Stan, 2018). Moreover, some investigators describe the liver lobes in the rabbit as cranial and caudal lobes. The caudal lobe is defined only as the caudate process, while all the other lobes are defined as the cranial lobes (Van Den Esschert et al., 2012; Huisman et al., 2014; Olthof et al., 2017; Páramo et al., 2017). Some researchers define the

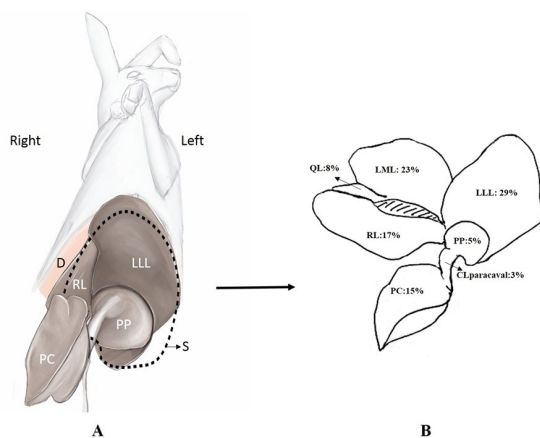


Figure 1: **A:** Liver position on rabbit, **B:** The distribution of liver lobes. Left lateral lobe (LLL), left medial lobe (LML), quadrate lobe (QL), right lobe (RL), caudate process (PC), papillary process (PP), paracaval portion (CL_{paracaval}), diaphragm (D), stomach boundaries (S)

lobes according to the course of the portal vein (Páramo et al., 2017). The gross anatomical divisions of the liver comprise the right, left, caudate and quadrate lobes (König and Liebich, 2007; Ellis, 2011). In the guidance of the reports of Stan (2018) and Stamatova-Yovcheva et al. (2012), the rabbit liver was divided into 5 lobes in this study according to anatomical terminology as left lateral, left medial, right, quadrate and caudate lobes. Apart from these standard lobes, the presence of paracaval region in the rabbit liver should also be considered. In addition to the similarities and differences in the definitions of the lobes, it is recommended that the researchers who work on experimental lobectomy in rabbits, also pay attention to the presence of the paracaval region.

The classical terminology of the gross anatomical lobes does not correspond to the functional division into eight hepatic segments, each with their own blood supply and the biliary drainage of human liver (Ellis, 2011). In liver surgery, the terms of segmentation of human liver is defined by the Terminology Committee of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (Strasberg et al., 2000; Abdala et al., 2004; Ellis, 2011; Strasberg, 2016). Although these terms do not not completely correspond to this segmentation, and there few studies comparing rat liver with human liver segments (Kogure et al., 1999; Martins et al., 2007). There are also studies describing macro-anatomically, the biliary drainage and vascularization of the liver in rabbits (Tam et al., 2014; Stamatova-Yovcheva et al., 2018). However, considering the experimental surgical studies of the liver in rabbits, further studies are needed to define the functional liver segments as in humans.

Various studies reporting surgical procedures like liver resection, lobectomy, embolism, and tumor always take into account the proportional distribution of

liver sections. It is also important to follow the amount of tissue loss in the liver, and determine postoperative liver volume with minimal functional remnant liver volume. In several studies, human liver is divided into lobes or segments and their proportional data are presented (Leelaudomlipi et al., 2002; Abdalla et al., 2004; Mise et al., 2014). The proportional distribution of each liver lobe relative to total liver weight is presented in detail in rats and mice which are commonly used animal models for such studies (Madrahimov et al., 2006; Martins et al., 2007; Aller et al., 2009b). Rabbits are also used as common laboratory animals for experimental hepatic surgical operations. There is scarce information about proportions of lobes (Dupre et al., 2012; Huisman, 2014; Liao et al., 2017), however, the ratios of each liver lobes to the total liver have not been reported in rabbit. Liao et al. (2017) indicated that it is 50% of the left lobe and 20% of the caudate lobe according to the total liver mass in rabbit. Dupre et al. (2012) stated that according to preliminary study data, it is 27.9% of the total liver volume of the left lateral lobe, while Huisman (2014) reported it as 25%. In this study, the detailed proportional values of each liver lobe's weight and volume were presented with respect to anatomical structures. According to total liver weight, the proportion of the left lateral lobe was approximately 27%, the left medial lobe 24%, the right lobe 19%, the quadrate lobe 7% and the caudate lobe was 23%. The volumetric ratios of lobes were close to the mass ratios.

The experimental hepatectomy models that are based on the removal of defined liver lobe combinations use approximately 30%, 50%, 70% and 90% resected liver volume (Madrahimov et al., 2006). The macro-anatomical and morphometric findings in this study showed that the lobes for rabbit liver surgery can be easily accessed (considering the depth of interlober notch) in the following order, the left lateral lobe (approximately 27-29%)> the caudate process (15-16%)> the papillar process (4-5%) for resection.

Research in experimental surgery suggests that the left lateral lobe should be removed for easy partial hepatectomy in rabbits (Dupre et al., 2012). In addition, if a partial hepatectomy, including the other lobes, is planned, the presence of a shallow incisura between the quadrate lobe and both the right lobe and the left medial lobe along with gallbladder in the region, can make it difficult to remove/resect. Furthermore, in order to prevent the development of small size syndrome the determination of postoperative liver volume is important in liver transplantation cases. In a healthy young person, 20-25% minimal functional remnant liver volume is sufficient, while, 30-60% remnant liver volume is needed in elderly or liver patient (Tucker and Heaton, 2005; Tüzün et al., 2015). As mentioned above, according to the morphological data the caudate and papillary process are easily removed together with the left lateral lobe,

therefore, the minimal functional remnant liver may remain in respect to the numerical data in the rabbit liver.

In some studies, the ratio of liver or lobes to live weight was also used (Urayama et al., 1999; Aller et al., 2009b). Therefore, these ratios were calculated for rabbits in the study. It is about 2% of total liver to body weight in human. The mice used as experimental animals are 3-5% BW (2-3 g) and the rat is 2-3% BW (4-5 g) (Rogers and Dintzis, 2018). In this study, mean liver weight was calculated as 2.51% BW in rabbits.

The ratio of caudate process to the total liver volume was defined as 15% in this study, while the volume of this segment is also stated as 22-26% in the experimental liver embolism studies in rabbit. The volume of the lobe was calculated using computed tomography in these studies (Van Lienden et al., 2011; Van Den Esschert et al., 2012; Páramo et al., 2017). Graaf et al. (2011) reported that the values measured by computed tomography are significantly larger than the direct volume measurements of liver lobes. Accordingly, investigators should consider the method of liver measurement in their studies.

The method of storage is limitation during which the water which may enter the blood vessels or bile ducts of liver or their contents change after discontinuation. However, as mentioned above, it is also worth noting that the computed tomographic volumetry calculates different results from direct anatomical measurements.

In conclusion; anatomical information may be a reference in performing various experimental surgical studies in rabbit liver. This study suggests that, the caudate and papillary processes together with the left lateral lobe are the easiest part of the liver for lobectomy, and approximately 50% functional remnant liver can continue to perform normal functions.

Acknowledgements

The author would like to thank Sanan RAZA for English language editing and Sercan KARDOĞAN for drawings.

References

- Abdalla EK, Denys A, Chevalier P, Nemr RA, Vauthey JN. Total and segmental liver volume variations: Implications for liver surgery. *Surgery* 2001; 135(4): 404-10.
- Alheani WA, Al-Kennany ER. Partial hepatectomy achievement by new device in rabbits model. *QJVM* 2013; 12(1): 1-14.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JLA, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver International* 2009a; 29(8): 1132-40.
- Aller MA, Lorente L, Prieto I, Moquillaza LM, Arias J. Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery. *Dig Liver Dis* 2009b; 41(10): 695-9.
- Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: Definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005; 5(11): 2605-10.
- Dupre A, Paradisi A, Langonnet S, Gandini A, Mehlen P, Rivoire M. Bevacizumab impairs hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in a rabbit model. *Anticancer Res* 32: 5193-200.
- Ellis H, 2011: Anatomy of the liver. *Surgery* 2012; 29 (12): 589-92.
- Graaf W, Esschert J W, Lienden K P, Roelofs JJTH, Gulik TM. A rabbit model for selective portal vein embolization. *J Surg Res* 2011; 171(2): 486-94.
- Huisman F, van Lienden K P, Damude S, Hoekstra L T, van Gulik T M. A review of animal models for portal vein embolization. *J Surg Res* 2014; 191(1): 179-88.
- Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6(2): 171-5.
- König HE, Liebich HG. Digestive System, Eds: König H.E and Liebich H-G. Schattauer, In: "Veterinary Anatomy of Domestic Mammals". 3rd edition, Germany 2007; pp:356-64.
- Kubota T, Takabe K, Yang M, Sekido H, Endo I, Ichikawa Y, Shimada H. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J Hep Bil Pancr Surg* 1997; 49 (1Suppl): 81-8.
- Leelaudomlipi S, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Ohkubo T, Makuuchi M. Volumetric analysis of liver segments in 155 living donors. *Liver Transp* 2002; 8(7): 612-4.
- Liao M, Zhang T, Wang H, Liu Y, Lu M, Huang J, Zeng Y. Rabbit model provides new insights in liver regeneration after transection with portal vein ligation. *J Surg Res* 2017; 209: 242-51.
- Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: From anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244(1): 89-98.
- Martins PNA, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2007; 28 (1): 3-11.

- Mise Y, Satou S, Shindoh J, Conrad C, Aoki T, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Three-dimensional volumetry in 107 normal livers reveals clinically relevant inter-segment variation in size. *HPB* 2014; 16(5): 439-47.
- Nevzorova YA, Tolba R, Trautwein C, Liedtke C. Partial hepatectomy in mice. *Lab Anim* 2015; 49 (51): 81-8.
- Olthof P B, Heger M, van Lienden K P, de Bruin K, Bennink R J, van Gulik T M. Comparable liver function and volume increase after portal vein embolization in rabbits and humans. *Surgery* 2017; 161 (3): 658-65.
- Palmes D, Spiegel H U. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25(9): 1601-11.
- Páramo M, García-Barquín P, Santa María E, Madrid J M, Caballeros M, Benito A, Sangro B, Inarrairaegui M, Bilbao JI. Evaluation of the rabbit liver by direct portography and contrast-enhanced computed tomography: anatomical variations of the portal system and hepatic volume quantification. *Eur Radiol Exp* 2017; 1(1):1- 7.
- Rahman MT, Hodgson HJF. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(2): 145-57.
- Rogers AB, Dintzis RZ. Hepatobiliary System/part13. Eds: Treuting P M, Dintzis S M, Montine K S, In: *Comparative Anatomy And Histology: A Mouse, Rat, And Human Atlas, Second Edition*. London: Elsevier, 2018; pp:229-39.
- Stamatova-Yovcheva K, Dimitrov R, Dilek ÖG. radiographic study of the topography of the hepatic vasculature and bile ducts of the rabbit. *Bulg J Agric Sci* 2018; 24(3): 497-502.
- Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 2009; 15(25): 3086-98.
- Tüzün S, Çakır M, Savaş O A, Tatar C. Hepatocellular carcinoma-liver resections. *Haseki Tıp Bülteni* 2015; 53(1): 1-9.
- Urayama M, Ishiyama S, Kuzumaki T, Ishikawa K, Fuse A, Kuzu H, Igarashi Y, Suto K, Tsukamoto M. Change of liver function in hypertrophying lobe of rabbit liver after portal branch ligation. *J Surg Res* 1999; 86(1): 55-61.
- Van Den Esschert J W, Van Lienden K P, Alles L K, Van Wijk A C, Heger M, Roelofs JJ, Van Gulik T M. Liver regeneration after portal vein embolization using absorbable and permanent embolization materials in a rabbit model. *Ann Surg* 2012; 255(2): 311-8.
- Van Lienden KP, van den Esschert JW, Rietkerk M, Heger M, Roelofs JJTH, Laméris JS, van Gulik TM. Chapter 9: Short-term effects of combined hepatic vein embolization and portal vein embolization on the induction of liver regeneration. In: *Clinical and Experimental Studies on Portal Vein Embolization / Diagnosis of Hepatocellular Adenoma and Focal Nodular Hyperplasia*, PhD thesis, Faculty of AMC-UvA, Amsterdam 2011; 9: 142-52.
- Zhang H, Liu T, Wang Y, Liu H F, Zhang J T, Wu Y S, Lei L, Wang H B. Laparoscopic left hepatectomy in swine: A safe and feasible technique. *J Vet Sci* 2014; 15(3): 417-422.
- Zou RH, Li AH, Han F, Hong J, Li BK, Huang W, Huang L, Yuan YF. Liver hypertrophy and accelerated growth of implanted tumors in nonembolized liver of rabbit after left portal vein embolization. *J Surg Res* 2012; 178(1): 255-63.



Kedilerde Medetomidin-Ketamin ve Zolazepam-Tiletamin Anestezilerinin Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması*

Nusret APAYDIN¹, Musa AYDINGÜLER²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
²Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Nusret APAYDIN; E-posta: nusretapaydin@gmail.com; ORCID: 0000-0003-0447-1216

Atif yapmak için: Apaydin N, Aydingüler M. Kedilerde medetomidin-ketamin ve zolazepam-tiletamin anestezilerinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 109-115.

Özet: Bu çalışma; kedilerde genel anestezi için yaygın olarak kullanılan medetomidin-ketamin anestezisi ile zolazepam-tiletamin anestezisinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinde oluşturduğu etkileri karşılaştırmak ve klinik yönden uygulanabilirliğini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini 32 adet kedi oluşturdu. Kedilerin 19 adeti dişi, 13 adeti ise erkek kedi idi. Kediler 6 ay ile 3 yaş arası ve 5.3±2.4 kg canlı ağırlığa sahiptiler. Çalışmamız; medetomidin (80 mcg/kg im)-ketamin (10 mg/kg im) grubu (Grup I) 16 kedi, zolazepam-tiletamin (15 mg/kg im) grubu (Grup II) 16 kedi olmak üzere 2 gruptan oluştu. Tüm kedilerden 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatlerde V. cephalica antebraçhidene hematolojik ve biyokimyasal ölçümler için kan alındı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede; İki grup arasında; hemoglobin (HGB) 120. dakika, lenfosit (LENF) 24. saat, lökosit (WBC) 0. dakika, kan üre azotu (BUN) 12. saat, glikoz (GLU) 120. dakika ölçümlerinde anlamlı fark bulundu (P<0.05). HGB, LENF, WBC, kreatin (CK), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve GLU ölçümlerinin 1. ve 2. gruplarında 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında, granulosit (GRAN) ve eosinofil (EOS) ölçümlerinin 1. grubunda 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında, gamma glutamil tranpeptidaz (GGT), ölçümlerinin 2. grubunda 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında anlamlı fark bulundu (P<0.05). Sonuç olarak; medetomidin-ketamin ve zolazepam-tiletamin anestezisinin kedilerde hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin olduğu ancak bu etkinin fizyolojik sınırlar içerisinde kaldığı belirlendi. Ancak anestezi bulguları yönünden medetomidin-ketamin anestezisinin zolazepam-tiletamin anestezisine göre daha iyi anestezi sağladığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Kedi, ketamin, medetomidin, tiletamin, zolazepam

Comparison of the Effects of Medetomidine-Ketamine and Zolazepam-Tiletamine Anesthesia on Hematologic and Biochemical Parameters in Cats

Summary: The aim of this study was to compare the effects of medetomidine-ketamine anesthesia and zolazepam-tiletamine anesthesia on hematological and biochemical parameters and to investigate its clinical applicability. The study material consisted of 32 cats. There were 19 female and 13 male cats. The cats were between 6 months and 3 years and had a live weight of 5.3 ± 2.4 kg. Our study; medetomidine (80 mcg/kg im)-ketamine (10 mg/kg im) group (Group I) consisted of 16 cats and zolazepam-tiletamine (15 mg/kg im) group (Group II) consisted of 16 cats. Of all cats, 0 minutes, 120 minutes, 12. hours and 24 hours. Blood was taken for v. cephalica antebraçhidene for hematological and biochemical measurements. In statistical evaluation; Between the two groups; There was a significant difference in hemoglobin (HGB) 120th minute and lymphocyte (LENF) 24th hour, leukocyte (WBC) 0 minutes, blood urea nitrogen (BUN) 12th hour, glucose (GLU) 120th minute measurements were significantly different (P<0.05). HGB, LENF, WBC, creatine (CK), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and GLU measurements in the 1st and 2nd groups of the 0th minute, 120th minute, 12th hour and 24th hour measurements, granulocyte (GRAN) and eosinophils (EOS) measurements in the first group the 0th minute, 120th minute, 12th hour and 24th hour, in the second group of gamma glutamil tranpeptidase (GGT) measurements, there was a significant difference between the measurements at 0th, 120th minutes, 12th and 24th hours (P<0.05). As a result; the effects of medetomidine-ketamine and zolazepam-tiletamine anesthesia on hematological and biochemical parameters in cats were determined, but this effect remained within physiological limits. However, in terms of anesthesia findings, medetomidine-ketamine anesthesia was found to provide better anesthesia than zolazepam-tiletamine anesthesia.

Key words: Cat, ketamine, medetomidine, tiletamine, zolazepam

Geliş Tarihi/Submission Date : 28.01.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 04.05.2020

*Bu makale Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL- 2018-8398 kodlu proje ve "Kedilerde Medetomidin-Ketamin ve Zolazepam-Tiletamin Anestezilerinin Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması" başlıklı tez çalışmasından üretilmiştir.

Giriş

Premedikasyon, genel anesteziyi başlatmadan önce değişik yollarla bir veya birkaç ilacın uygulanmasıdır. Preanestezi, hayvanın daha kolay bir şekilde anesteziyeye girişine, anestezinin devamına olanak sağlar.

Preanestezik ilaçlar ya tek başına ya da birkaç ilaç ile kombine halde kullanılırlar. Bu ilaçlar; sedasyonu sağlamak, anestezide girişi kolaylaştırmak, oluşabilecek komplikasyonları engellemek ve kullanılacak genel anestezik ilaç miktarını azaltmak için kullanılır (Apaydın, 2019; Koç ve Sarıtaş, 2004).

Medetomidin, küçük hayvan hekimliğinde yaygın olarak kullanılan α_2 -adrenoseptör agonisti bir ilaçtır. α_2 -adrenoseptör agonistlerin temel amacı sedasyon oluşturmalarıdır. Bu etkilerinin yanı sıra sentral ve spinal etkilerine bağlı olarak kaslarda relaksasyon ve analjezi meydana getirirler (Kanda ve Hikasa, 2008; Ko ve ark., 2007; Yaygıngül ve Belge, 2018). Sedatif etkilerinin süresi ortalama 1-2 saat olmakla beraber verilen doza bağlıdır ve zaman zaman 6 saate kadar uzayabilir. Analjezik etki sedasyon süresinden daha kısadır ve yaklaşık 1 saat kadardır. Güçlü etkilerine rağmen ağrılı cerrahilerde tek başına kullanılmazlar. Medetomidinin en büyük avantajı, etkilerinin atipamezol ile tersine çevrilebilmesidir (Çetinaslan ve Apaydın, 2008). Premedikasyon için kullanılırsa doz miktarının düşürülmesi tercih edilir. Kedilerde kullanılan doz 80-150 mcg/kg im arasında değişmektedir. Kedilerde Medetomidin ile doza bağlı sedasyon oluşur (Topal, 2005). Kedilerde de % 90 oranında kusma, trombositlerde kümeleşme, plazma insülin düzeyini düşürecek hiperglisemiye neden olma gibi yan etkileri bulunmaktadır (Çetinaslan ve Apaydın, 2008; Kanda ve Hikasa, 2008).

Zolazepam; dissosiyatif ilaç grubunda yer alan tiletamin ile kombine olarak kullanılır. Suda çözünürlüğü olan bir benzodiazepin türevidir. Zolazepam'ın farmakokinetik etkisi diazepam ve midazolam'a benzer. Diazepam ve midazolamdan daha az etkilidir, yüksek dozları ise ekstasyon ve ruhsal değişimlere neden olabilir (Hamton ve ark., 2019; Li ve ark., 2015; Mair ve ark., 2014; Yanmaz ve ark., 2017).

Ketamin ve tiletamin ile oluşturulan anestezilerde refleksler büyük oranda değişmeden kalır. Hastalarda sese, ışığa ve diğer uyarılara karşı hassasiyet artmıştır. Kas tonusu artar, hatta rijitite oluşur. Vücut gergin haldedir. Visseral ağrıyı tam olarak ortadan kaldırmadığı için abdominal operasyonlarda tek başına kullanılmamalıdır (Topal, 2000). Dissosiyatif anestezikler hem iv hem de im yolla uygulanabilirler. Bunun nedeni anestezik doz güvenlik sınırının geniş olmasıdır. Solunumda ara sıra soluk tutma şeklinde göze çarpan bir etki oluşturur. Kardiyovasküler sistemde diğer anesteziklerden farklı olarak kalp hızı artar, kan basıncı yükselir ve kardiyak kontraktilite artar. Karaciğerde metabolize olur ve böbrek yoluyla değişmeden atılırlar. Karaciğer ve böbrek rahatsızlığı olan hastalarda dikkatli ve düşük doz uygulanmalıdır (Apaydın, 2019; Topal, 2005).

Ketamin; dissosiyatif bir anestezi olarak bilinçsizlik ve

somatik anestezi içeren kataleptik etki oluşturur. Diğer sinir sistemini deprese eden ilaçlara göre avantajı kardiyovasküler sistemi stimüle etmesidir (Gebremedhin ve ark., 2018; Karasu ve ark., 2018; Kaya ve ark., 2002). Uygun bir premedikasyon uygulamasını takiben 10-30 mg/kg im uygulandığında 45-60 dakika, 5-10 mg/kg iv uygulandığında 15-20 dakika süren bir anestezi sağlar. Anestezi süresini uzatmak için başlangıç dozunun yarısı uygulanabilir. Ketamin kedilerin karaciğerinde az oranda metabolize olur ve enjekte edilen miktarın büyük bir bölümü değişime uğramadan atılır. Ketamin, hepatik ve renal disfonksiyonu olan hayvanlarda dikkatli bir şekilde uygulanmalıdır (Apaydın, 2019; Topal, 2005).

Tiletamin-zolazepam kombinasyonu; kedi ve köpeklerde diagnostik ve küçük cerrahi işlemler için im ve iv olarak kullanılan; düşük dozlarda kullanıldığında sedasyon yüksek dozlarda ise anestezi sağlayan etkili bir ilaç kombinasyonudur (Kaya ve ark., 2002). Tiletamin-zolazepam birçok evcil ve vahşi hayvan türünde de kullanılmaktadır (Hampton ve ark., 2019). Tiletamin, kataleptik özellikte, beyaz renkli, suda kolay çözülen immobilizasyon ve analjezik etkisi ketamine oranla daha uzun süreli dissosiyatif anestezik madde grubundadır. Genellikle zolazepam ile birlikte kullanılır. Tiletamin, kasları gevşetmez veya kranial sinir ve spinal refleksleri etkilemez. Bununla birlikte, zolazepam ilavesi ile kas gevşemesi oluşur (Ko ve ark., 2007). Kedilerde tiletamin-zolazepam im ve iv enjeksiyonundan 1.5 - 6 dakika sonra cerrahi anestezi başlar. Kedilerde bu kombinasyonun güvenlik sınırı geniş olup, önerilen dozların 4.5 katına kadar olumsuz etki görülmez. Kedi ve köpeklerde 10 mg/kg iv, 15-25 mg/kg im uygulanabilir (Topal, 2005). Güvenlik sınırının genişliği, anestezide girişin hızlı ve rahat olması, kas gevşemesinin ve ağrı kesici etkisinin iyi olması, kalp ve solunum sistemlerine baskılayıcı etkisinin hızlı ve rahat şekillenmesi ilacın olumlu yönleridir. Tiletamin-zolazepam tek başına veya diğer ilaçlarla kombine olarak da kullanılabilir (Ko ve ark., 2007; Lu ve ark., 2014; Spada ve ark., 2015).

Anestezi öncesi, sırasında ve sonrasında hastadan alınan kan örneklerinden biyokimyasal, hematolojik ölçümler başarılı bir anestezinin temelini oluşturur. Hayvanın anestezi öncesi durumunu belirlemek ve uygun anestezik ilacın seçimi için kan parametrelerinin belirlenmesi önemli ve gereklidir. Dolayısıyla bu parametreleri etkilemeyen ya da en az etkileyen anestezik ilaçlar kullanılmalıdır (Çetinaslan ve Apaydın, 2008; Rashid, 2017; Zlateva ve Marinov, 2015).

Çalışmamız; medetomidin-ketamin ve zolazepam-tiletamin anestezisinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin karşılaştırılarak uygun olan anestezi seçeneğinin belirlenmesi ve klinik yönden uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla gerçekleştirildi.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini; 19 adet dişi, 13 adet erkek kedi olmak üzere toplam 32 adet kedi oluşturdu. Kediler 6 ay ile 3 yaş arası ve 5.3 ± 2.4 kg canlı ağırlığa sahiptiler.

Çalışma öncesinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'un dan (10.01.2018 tarih ve 18/012 sayılı karar) izin alındı. Çalışma materyallerini Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Cerrahi Kliniği ile Ankara İncek Petlife Veteriner Kliniği'ne radyolojik tanı, minör cerrahi, orchioktomi, ovariohisterektomi ve kırık operasyon için getirilen 32 adet kedi oluşturdu.

Anestezi öncesi 12 saat tüm kediler aç bırakıldı, sadece su verildi. Bütün olguların klinik muayeneleri yapıldı. V. cephalica antibrachi ye kateter yerleştirildi.

Çalışmamız; medetomidin-ketamin grubu (Grup I) 16 kedi, zolazepam-tiletamin grubu (Grup II) 16 kedi olmak üzere 2 gruptan oluştu. Tüm kedilerden 0. dak., 120. dak., 12. saat ve 24. saatlerde v. cephalica antibrachiden hematolojik ve biyokimyasal ölçümler için 5 ml kan alındı. Bu kanlar; 1 adet EDTA' lı, 1 adet vakumlu serum tüpüne paylaştırıldı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaşma problemiyle karşılaşıl-maması ve tüm kanın EDTA ile homojen bir şekilde karışması için düzgün dairesel hareketlerle sallandı.

Grup I deki 16 kedi için preanestezik olarak 80 mcg/kg im medetomidin (Tomidin®, Provet), 10-15 dakika sonra genel anestezik olarak 10 mg/kg im ketamin (Ketasol %10) ®, Richterpharma ag) uygulandı. Grup II de ki 16 kedi için zolazepam- tiletamin (Zolatil® 50, Virbac) ugulandı. 1 şişe içeriği, 5 ml' lik enjeksiyonluk su ile sulandırılarak 1 ml' si 50 mg' lık etken madde (25 mg tiletamin + 25 mg zolazepam) içeren Zolatil® 50'den 15 mg/kg im uygulandı. Olguların operasyon süreleri ortalama 45-60 dakika sürdü. Kedilerin postanestezi dönemi yoğun bakım özelliği olan kafeslerde gerçekleştirildi. Bütün refleksler yerine geldikten sonra olgular normal bakım ünitesine alındı.

İki grup için de EDTA' lı tüplere aldığımız kan örneklerinden hematolojik inceleme için; eritrosit (RBC), hematokrit (HCT), hemoglobin (HGB), lenfosit (LENF), lökosit (WBC), granulosit (GRAN), eosinofil (EOS), trombosit (PLT) değerlerine bakıldı. Bu ölçümler için Mindray BC-2800 Vet China marka otomatik kan sayım cihazından yararlanıldı.

İki grup için de vakumlu serum tüplerine aldığımız kan örneklerinden biyokimyasal inceleme için; kreatin (CK), kan üre azotu (BUN, gamma glutamil tran-peptidaz (GGT), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve glikoz (GLU) değerlerine bakıldı. Bu ölçümler için RANDOX rx monaco UK tam otomatik biyokimya cihazı kullanıldı.

İstatistik analizler: Verilerin normal dağılıma uygunluğu Q-Q plot, histogram grafikleri ve Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Sıfırıncı dak, 120. dak., 12. saat ve 24. saatler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önem kontrolleri Friedman testi, farklılığın önemli olduğu parametrelerde Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önem kontrolleri ise Mann Whitney U testi ile yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri Ortalama \pm Standart hata ile gösterildi. İstatistiksel analizlerde NCSS 9 programı kullanıldı.

Bulgular

Grup I deki olgularımıza medetomidin-ketamin uygulandı. Yedinci olguda solunum sayısı 32/dak dan 12/dak.ya düştüğü için doxapram 5 mg/kg iv (Doxaprol Provet) uygulandı. Onbirinci olguda uyanma aynı grubun diğer olgularına göre 12 dakika daha erken oldu. Ondördüncü olguda uyanma 21 dakika daha geç şekillendi. Hipotermi şekillenen 15. olgunun vücut sıcaklığı (34.8 °C) sıcak su torbalarıyla normale döndürüldü. Grup I olgularında uyanma süresi Grup II ye göre 10-20 dakika aralığında daha geç gerçekleşirken, uyanmadaki konfor Grup II ye göre daha iyi idi.

Grup II de ki tüm olgular da anestezi süresince solunumun çok yüzeysel olduğu, palpebral reflekslerin çok belirgin olduğu belirlendi. Kediler için uzun süren operasyonlarda önerilen dozun (15 mg/kg) yeterli olmadığı görüldü. Zolazepam-tiletamin grubunda uyanma sürelerinin medetomidin-ketamin grubuna oranla 10-20 dakika daha erken şekillendiği görüldü. Zolazepam-tiletamin grubunda olguların 2 si hariç (25 mg/kg im uygulanan 15 ve 16 no lu olgular) diğerlerinin hepsinde anestezi çıkışında ekstasyon gözlemlendi.

İki grup arasında; HGB değişkeninin 120. dakika ölçümleri (P=0.035), LENF değişkeninin 24. saatteki ölçümleri (P=0.047), WBC değişkeninin 0. dakikadaki ölçümleri (P=0.039), BUN değişkeninin 12. saatteki ölçümleri (P=0.043), GLU değişkeninin 120. dakika ölçümleri (P=0.007) arasında anlamlı fark bulundu (P<0.05). Diğer değişkenler bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı (P>0.05).

HGB, LENF, WBC, creatin, ALT, AST VE GLU değişkenlerinin 1. ve 2. gruplarında 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında anlamlı fark bulundu (P<0.05). GRAN ve EOS değişkeninin 1. grubunda 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında anlamlı fark bulundu (P<0.05). GGT değişkeninin 2. grubunda 0. dakika, 120. dakika, 12. saat ve 24. saatteki ölçümleri arasında anlamlı fark bulundu (P<0.05). Diğer değişkenlerin grupları içinde tekrar eden ölçümler arasında anlamlı farklılık bulunmadı (P>0.05) (Tablo 1).

Tablo 1. Kedilerde medetomidin-ketamin ve zolazepam-tiletamin anesteziyelerinin hematolojik ve biyokimyasal parametrelerinde, grupların ve tekrarlayan ölçüm sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Değişkenler	Zaman (Ort±St Hata)				P Değeri (Friedman Tes- ti)
	0.Dakika	120. Dakika	12. Saat	24. Saat	
RBC					
1.Grup	10.20±0.63	7.72±0.60	8.60±0.52	9.06±0.60	0.133
2.Grup	9.80±0.78	9.07±0.57	8.91±0.70	7.97±0.62	0.157
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.780	0.094	1.000	0.196	
HCT					
1.Grup	44.83±2.95	32.67±2.46	36.91±2.09	39.39±2.61	0.073
2.Grup	43.31±2.93	41.16±3.85	40.1±3.94	34.56±2.31	0.069
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.724	0.061	1.000	0.110	
HGB					
1.Grup	15.44±0.66 ^a	11.41±0.84 ^b	12.99±0.79 ^{ab}	14.35±0.98 ^{ab}	0.010
2.Grup	16.56±1.21 ^a	14.39±1.12 ^{ab}	14.69±1.45 ^{ab}	12.68±0.83 ^b	0.033
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.752	0.035	0.780	0.119	
LENF					
1.Grup	10.14±3.86 ^a	4.22±1.27 ^b	9.68±4.72 ^b	5.06±1.66 ^b	0.002
2.Grup	11.73±3.09 ^a	4.13±0.87 ^b	11.54±5.41 ^b	8.20±2.03 ^{ab}	0.011
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.102	0.491	0.224	0.047	
WBC					
1.Grup	13.93±2.63 ^{ab}	9.97±1.94 ^a	19.45±5.22 ^b	16.53±3.46 ^b	0.001
2.Grup	21.32±3.52 ^{ab}	12.43±1.69 ^a	25.03±5.42 ^b	20.51±2.82 ^{ab}	0.003
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.039	0.110	0.196	0.128	
GRAN					
1.Grup	6.28±1.09 ^{ab}	5.36±1.20 ^a	11.16±1.78 ^b	10.74±1.73 ^b	<0.001
2.Grup	8.50±1.19	7.76±1.09	12.71±1.94	11.59±1.87	0.085
P Değeri (Mann Whitney U Testi)	0.160	0.067	0.539	0.752	

^{a, b, c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır.

RBC (eritrosit), HCT (hematokrit), HGB (hemogloblin), LENF (lenfosit), WBC (lökosit), GRAN (granulosit), EOS (eosinofil), PLT (trombosit), CK (kreatin), BUN (kan üre azotu), GGT (gamma glutamil tranpeptidaz), ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), GLU (glikoz)

Tartışma ve Sonuç

Medetomidin, son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir α_2 -adrenoseptör agonisti bir ilaçtır. Kaslarda relaksasyon ve analjezi meydana getirir. Sedatif etkilerinin süresi ortalama 1-2 saat olmakla beraber verilen doza bağlıdır ve zaman zaman 6 saate kadar uzayabilir. Analjezik etki sedasyon süresinden daha kısadır ve yaklaşık 1 saat kadardır. Güçlü etkilerine rağmen ağırlı operasyonlarda tek başına kullanılmazlar. Kedilerde % 90 oranında kusma, trombositlerde kümeleşme, plazma insülin düzeyini düşürecek hiperglisemiyeye neden olma gibi yan etkileri bulunmaktadır (Apaydın, 2019; Çetinaslan ve Apaydın, 2008; Yaygınül ve Belge, 2018; Kanda ve Hikasa, 2008). Ça-

lışmamızın Grup 1 deki olgularında premedikan ilaç olarak medetomidin kullanıldı. Bütün olgularımızda sedasyon sağlanırken operasyon süresince de analjezinin sağlandığı görüldü. Ketamin ile birlikte uygulandığından dolayı ideal bir anestezi sağlandı. Ağırlı operasyonlarda tek başına medetomidin kullanılmasının uygun olmayacağına karar verildi. Medetomidin uygulanan bütün olgularımızda kusma görüldü. GLU değişkenininin 120. dakikadaki ölçümü bakımından anlamlı fark bulundu (P=0.007). 0. dakika ölçüm değeri 100.90±8.64 iken medetomin uygulandıktan sonra 120. dakika ölçüm değerleri 193.67±19.96, 12. saat 116.42±10.61 ve 24. saat ölçüm değeri ise 101.06±4.51 olarak kaydedildi. Medetomidin uygulan-

diktan sonra kan glikoz düzeyinin arttığı ancak bunun hiperglisemi oluşturacak düzeye kadar çıkmadığı, etkisinin geçmesinden sonra kan glikoz düzeyinin tekrar düştüğü görüldü.

Zolazepam, tiletamin ile kombine olarak kullanılır. Suda çözünürlüğü olan bir benzodiazepin türevidir. Yüksek dozları ise ekstasyon ve ruhsal değişimlere neden olabilir (Hamton ve ark., 2019; Mair ve ark., 2014). Kedi ve köpeklerde diagnostik ve küçük cerrahi işlemler için im ve iv olarak kullanılan; düşük dozlarda kullanıldığında sedasyon yüksek dozlarda ise anestezi sağlayan etkili bir ilaç kombinasyonudur (Kaya ve ark., 2002). Kedilerde bu kombinasyonun güvenlik sınırı geniş olup, önerilen dozların 4.5 katına kadar olumsuz etki görülmez. Kedi ve köpeklerde 10 mg/kg iv, 15-25 mg/kg im uygulanabilir (Topal, 2005). Güvenlik sınırının genişliği, anesteziye girişin hızlı ve rahat olması, kas gevşemesinin ve ağrı kesici etkisinin iyi olması, kalp ve solunum sistemlerine baskılayıcı etkisinin hızlı ve rahat şekillenmesi ilacın olumlu yönleridir. Salivasyonu artırması ve hazırlanan çözeltinin 3 gün içerisinde tüketiminin zorunlu olması ilacın olumsuz yönleridir. Uygulandıktan sonra hipotermi, taşikardi, kusma ve ajitasyon gibi olumsuz etkiler görülebilir (Ko ve ark., 2007; Lu ve ark., 2014; Spada ve ark., 2015; Li ve ark., 2015; Yanmaz ve ark., 2017). Araştırmamızda 5 ml' lik enjeksiyonluk su ile sulandırılarak 1 ml' si 50 mg' lik etken madde (25 mg tiletamin + 25 mg zolazepam) içeren Zolatil® 50'den 15 mg/kg im uygulandı. Olgularımızın cerrahi süresi ortalama 60 dakika idi. Anesteziye giriş hızlı ve rahat oldu. Ancak bazı olgularda salivasyon artışı gözlemlendi. Uygulanan 15 mg/kg im dozun yeterli olmadığı belirlendi. Cerrahi sırasında olguların ağrı duyduğu ve bazı olgularda idame doz uygulaması yapılması gerektiği görüldü.

Ketamin kas gevşemesini sağlamak, nöbet veya konvülsiyonları önlemek için $\alpha 2$ agonisti ile birlikte kullanılabilir (Topal, 2005). Tek başına Ketamin ile anestezide genellikle aşırı tükrük salgısı, kas sertliği ve çirpınma oluşur (Çetinaslan ve Apaydın, 2008). Medetomidine-ketamine kombinasyonu, hızlı indüksiyon, iyi kas gevşemesi, iyi analjezi ve bradikardi ile karakterize kediler için uygun bir anestezi oluşturur (Heidari ve ark., 2017). Çalışmamızda ketamin tek başına kullanılmadı. Preanestezik olarak 80 mcg/kg im medetomidin, 10-15 dakika sonra genel anestezik olarak 10 mg/kg im ketamin uygulandı. Medetomidine-ketamine anestezi protokolünün, hızlı indüksiyon, iyi kas gevşemesi, iyi analjezi sağlayan kediler için uygun bir anestezi oluşturduğu belirlendi.

Hayvanın anestezi öncesi kan parametrelerinin belirlenmesi, güvenli anestezi protokolünün uygulanması yönü ile önemlidir. Anestezi öncesi böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri hastanın prognozu yönünden önemlidir. Karaciğer ve böbrek fonksiyon değerlerinin fizyolojik sınırlar içerisinde olmaması patolojik bir

durumun göstergesidir. Ancak bu değerler tek başına tanı konulması için yeterli değildir (Apaydın ve Koç, 2005; Çetinaslan ve Apaydın, 2008; Rashid, 2017; Zlateva ve Marinov, 2015). Araştırmamız iki anestezi protokolünün hematolojik ve biyokimyasal parametrelere olan etkilerini içermektedir. Çalışmamız; anestezi öncesi hastaların hematolojik ve biyokimyasal kan değerlerinin belirlenmesinin, gerek yapılan cerrahiye gerekse uygulanan anestezi protokolünü direkt etkilediğini ortaya koydu. Bu nedenle preanestezi döneminde hastadan alınan kan örneklerinden elde edilecek bu laboratuvar bulgularının değerlendirip buna göre anestezi protokolü belirlenmesinin temel prensip olması gerektiği görüldü.

Tavşanlarda xylazine-zolazepam-tiletamin ve xylazine-ketamine genel anestezilerinin karşılaştırıldığı çalışmada (Kaya ve ark., 2002); anestezi süresi, derinliği ve fizyolojik parametreler yönünden xylazine-zolazepam-tiletamin anestezisinin tercih edilebilir bir anestezi yöntemi olduğu belirlenmiştir. Araştırmamız medetomidin-ketamin ile zolazepam-tiletamin anestezi protokollerinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin karşılaştırılmasını kapsamaktadır. Bu parametreler üzerine her iki anestezi protokolünün etkisi fizyolojik sınırlar içerisinde oldu. Ancak kedilerde medetomidin-ketamin anestezisinin zolazepam-tiletamin anestezisine göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi. Zolazepam-tiletamin grubunda Kaya ve ark. (2002) ikinci bir premedikan ilaç olan xylazin kullanmışlardır. Biz çalışmamızda sadece zolazepam ve tiletamin içeren ilaç kullandık, bu nedenle tavşanlarda önerilebilen bir protokol olmasına rağmen kediler için sadece zolazepam-tiletamin anestezisinde 15 mg/kg dozun uygun olamayacağı ya da Kaya ve ark. (2002) tarafından uygulandı gibi ilave bir premedikan ilacın kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Tiletamin-zolazepam-xylazin ve ketamin-xylazin kombinasyonunun buzağılarda oluşturduğu anestezik etkinin ortaya konmasını amaçlayan çalışmada (Şındak ve ark., 2003); tiletamin-zolazepam-xylazin kombinasyonunun, ketamin-xylazin kombinasyonundan daha etkili ve uzun süreli anestezi oluşturduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda zolazepam-tiletamin uygulandı. İkinci bir premedikan ilaç uygulanmadı. Bu nedenle ideal anestezi sonuçları elde edilemedi. Ancak zolazepam-tiletaminin protokolünün değişik dozları araştırma konusu olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda 15 mg/kg dozun kedi ovariohisterektomi operasyonu için yeterli olmadığı belirlendi.

Kedilerde tiletamin-zolazepam (15 mg/kg im) ve xylazine-ketamin (2 mg/kg-10 mg/kg) anestezisinin karşılaştırıldığı çalışmada (Topal, 2000); preanestezik durum, indüksiyon zamanı, indüksiyon kalitesi, analjezi, kas gevşemesi, sternal pozisyon ve uyanma kalitesi yönünden değerlendirme yapılmıştır. Her iki anestezi protokolünün de uygulanması güvenli bulun-

muş, ancak xylazin-ketamin uygulamasının tiletamin-zolazepam göre daha uzun indüksiyon zamanı ve daha az analjezi oluşturduğu, 15 mg/kg zolazepam-tiletamin dozunun kediler için güvenli bir anestezi oluşturduğu belirlenmiştir. Araştırmamız da zolazepam-tiletamin 15 mg/kg uygulandı. Sonuçlarımız; 15 mg/kg dozun kediler için yeterli olmadığını gösterdi.

Köpeklerde medetomidinin 15 mg/kg dozunun klinik ve hematolojik parametrelere olan etkilerini belirleyen araştırmada (Akbar ve ark., 2014); medetomidinin güvenli bir anestezi ve hiçbir komplikasyon oluşmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda medetomidin 40 mcg/kg uygulandı ve güvenli bir anestezi sağlandı medetomidin-ketamin grubunda hiçbir komplikasyon ile karşılaşmadı. Medetomidinin uygun bir premedikan ilaç olduğu görüşüne varıldı.

Tiletamin ve zolazepam anestezi kombinasyonunun klinik ve hematolojik değişkenleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada (Spada ve ark., 2015); düşük doz (10 mg/kg) tiletamin-zolazepam anestezisi kullanılarak sağlıklı kedilerden maksimum 60 ml kan alınmasının donörler tarafından iyi tolere edildiği görülmüştür. Araştırmamızda zolazepam-tiletamin anestezi protokolü 45-60 dakika sürecek operasyonlar için uygulandı. Çok kısa süreli işlemler için zolazepam-tiletamin anestezisi uygulanabileceği ancak uzun süreli cerrahi prosedürler de bu anestezi protokolünün uygun olmayacağı belirlendi. Zolazepam-tiletamin grubunun 10 no lu olgusunda sadece radyografik çekim yapıldı. Bu olguda 15 mg/kg dozun yeterli olduğu görüldü. Ancak cerrahi prosedürler de bu dozun yeterli olmadığını belirlendi.

Tiletamin-zolazepam-xylazin-tramadol kombinasyonunun kedilerde biyokimyasal ve hematolojik parametrelere olan etkisinin (Li ve ark., 2012); fizyolojik sınırlar içerisinde kabul edilebilir olarak değerlendirilmiş ve uygun bir anestezi protokolü olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızdaki zolazepam-tiletamin grubunda da hematolojik ve biyokimyasal parametreler istatistiksel farklılıklara rağmen fizyolojik sınırlar içerisinde değişiklikler gösterdi. Zolazepam-tiletaminin hematolojik ve biyokimyasal parametreleri etkilemediği belirlendi.

Beagle köpeklerinde medetomidinin nörohormonal ve metabolik etkilerini, xylazin ile karşılaştıran araştırmacılar (Ambrisko ve Hikasa, 2002); her iki premedikan ilacın da glukoz düzeyini arttırdığını belirlemişlerdir. Medetomidinin, glukoz metabolizması üzerindeki etkisinin, yalnızca alfa 2-adrenoseptör aracılı etkilere bağlı olmayabileceğini belirlemişlerdir. Çalışmamızın medetomidin-ketamin grubunda glukoz ölçümlerinde 0. dakika ölçüm değeri 100.90±8.64 iken medetomidin uygulandıktan sonra 120. dakika ölçüm değeri 193.67±19.96 olarak belirlendi. Medetomidinin hiperglisemi etkisi olduğu görüldü. Medetomidinin etkisi geçtikten sonra glukoz seviyesi tekrar düştü. Medeto-

midinin glukoz metabolizması üzerine etkili olduğu belirlendi.

Tiletamin-zolazepam ve tiletamin-zolazepam-xylazin kombinasyonlarının anestezi etkilerini köpekler üzerinde değerlendiren araştırmacı (Şındak, 1998); ölçüm sonuçlarının hematolojik ve biyokimyasal kan parametrelerinde minimal etkiler meydana getirdiğini, ayrıca mükemmel kas gevşemesi sağlayarak uygun anestezi koşullar oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Köpeklerde tiletamin-zolazepam ve tiletamin-zolazepam-xylazin kombinasyonlarının pratikte uygulanabileceği, tiletamin-zolazepam-xylazinin, tiletamin-zolazepamdan daha etkili ve daha uzun süreli anestezi sağladığı sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmamızda zolazepam-tiletamin kedilerde uygulandı. İkinci bir premedikan ilaç uygulanmadı. Ancak protokolümüzde xylazin de eklenseydi daha konforlu bir genel anestezi sağlanabileceği belirlendi.

Köpeklerde medetomidin propofol isofluran anestezi sinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisini belirleyen çalışmada (Oskay ve Atalan, 2010); propofol uygulandığında apne oluşturması nedeniyle gerekli önlemlerin alınması gerektiği ve bu anestezi protokolünün güvenli bir şekilde kullanılabilmesini bildirmişlerdir. Çalışmamızda; Medetomidin uygulanan grubun hematolojik ve biyokimyasal parametreleri fizyolojik sınırlar içerisinde etkilediği görüldü. Medetomidinin bu ölçüm değerleri üzerine minimum düzeyde etkisi olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; kedilerde medetomidin-ketamin ve zolazepam-tiletamin anestezi sinin hematolojik ve biyokimyasal parametrelere minimum düzeyde etkilediği belirlendi. Bu etkilerin referans aralıkları içerisinde olduğu saptandı. Medetomidin-ketamin anestezi sinin zolazepam-tiletamin anestezi sine göre daha etkili bir anestezi oluşturduğu belirlendi.

Teşekkür

Bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Akbar H, Khan MA, Khan MS, Aslam S, Nasir A, Anjum AA. Effects of different doses of medetomidine on clinical and hematological parameters in dogs. J Anim Plant Sci 2014; 24 (3): 730-7.
- Ambrisko TD, Hikasa Y. Neurohormonal and metabolic effects of medetomidine compared with xylazine in beagle dogs. Can J Vet Res 2002; 66: 42-9.
- Apaydın N, Koç B. Köpeklerde isoflurane ve sevoflurane anestezi sinin hemodinamik ve biyokimyasal parametrelere olan etkilerinin karşılaştırılması. Vet Cer Derg 2005;11(1-2-3-4):31-5.

- Apaydın N. Veteriner Anestezi. İkinci Baskı. Malatya: Medipress, 2019; s. 17-44.
- Çetinaslan M, Apaydın N. Köpeklerde medetomidin-ketamin-atipamezol anestezisinin hematolojik ve biyokimyasal parametrelere olan etkileri. Sağlık Bilim Derg 2008; 17(2): 110-6.
- Gebremedhin Y, Negash G, Fantay H. Clinical evaluation of anesthetic combinations of xylazine-ketamine, diazepam-ketamine and acepromazine-ketamine in dogs of local breed in mekelle, ethiopia. SOJ Vet Sci 2018; 4(2): 1-9.
- Hamton CE, Riebold T W, Ronald E. Recovery characteristics of dogs following anesthesia induced with tiletamine-zolazepam, alfaxalone, ketamine-diazepam, or propofol and maintained with isoflurane. J Am Vet Med Assoc 2019; 254(12): 1421-6.
- Heidari F, Javdani M, Sadegh AB, Nikouseft Z. Does ketamine-midazolam combination act as a routine and safe chemical restraint in cats? Clinical and hemato-biochemical evaluation. Comp Clin Path 2017; 26(4): 793-7.
- Kanda T, Hikasa Y. Neurohormonal and metabolic effects of medetomidine compared with xylazine in healthy cats. Can J Vet Res 2008; 72: 278-86.
- Karasu A, Altuğ N, Aslan L, Bakır B, Yüksek N. Evaluation of the anesthetic effects of xylazine-ketamine, xylazine-tiletamine-zolazepam and tiletamine-zolazepam using clinical and laboratory parameters in rabbits. Med Weter 2018; 74 (10): 646-52.
- Kaya Ü, Apaydın N, Kaya A, Koç B. Tavşanlarda xylazine-tiletamine-zolazepam ve xylazine-ketamine anestezilerinin kardiovasküler ve respiratorik etkilerinin karşılaştırılması. Vet Cer Derg 2002; 8(3-4): 63-8.
- Ko JCH, Abbo LA, Weil AB, Johnson BM, Payton MA. Comparison of anesthetic and cardiorespiratory effects of tiletamine-zolazepam-butorphanol and tiletamine-zolazepam-butorphanol-medetomidine in cats. Vet Ther 2007; 8(3): 164-75.
- Koç B, Sarıtaş ZK. Veteriner Anesteziyoloji ve Reanimasyon. Birinci Baskı. Malatya: Medipress, 2004; s. 79-87.
- Li L, Dong J, Lu D, Jiang S, Lin D, Fan H. Effects of tiletamine-zolazepam-xylazine-tramadol combination on biochemical and haematological parameters in cats. Vet Ther 2012; 56: 369-72.
- Li L, Dong J, He J, Cui J, Yu X, Tan D, Fan H. Anesthetic effects of tiletamine-zolazepam-xylazine-tramadol combination in cats undergoing surgical sterilization. Acta Vet Brno 2015; 84: 181-5.
- Lu DZ, Jiang S, Yu SM, Fan HG. A comparison of anesthetic and cardiorespiratory effects of tiletamine-zolazepam/xylazine and tiletamine-zolazepam/xylazine/tramadol in dogs. Pak Vet J 2014; 34 (1): 63-7.
- Mair A, Kloeppel H, Ticehurst K. A comparison of low dose tiletamine-zolazepam or acepromazine combined with methadone for pre-anaesthetic medication in cats. Vet Anaesth Analg 2014; 41: 630-5.
- Oskay B, Atalan G. Köpeklerde medetomidin-propofol-isofluran anestezisinin hematolojik ve biyokimyasal parametrelere olan etkileri. Sağlık Bilim Derg 2010; 19(3):167-74.
- Rashid HB. Evaluation of effects of different combinations of selected sedatives on the hematological profile of standing sedates horses. J Anim Plant Sci 2017; 27(6): 1879-87.
- Spada E, Proverbio D, Giorgi GBD, Perego R, Valena E, Pepa AD, Baggiani L. Clinical and haematological responses of feline blood donors anaesthetised with a tiletamine and zolazepam combination. J Feline Med Surg 2015; 17(4): 338-41.
- Şındak N. Köpeklerde tiletamin-zolazepam ve tiletamin-zolazepam-xylazin anestezisi, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniv Sağ Bil Ens, Van 1998.
- Şındak N, Yürekli UF, Sertkaya H, Şakar M. Buzağılarda tiletamin-zolazepam-xylazin ve ketamin-xylazin anestezisi. Turk J Vet Amin Sci 2003; 27: 775-9.
- Topal A. Kedilerde tiletamin/zolazepam ve xylazine/ketamin anestezisinin karşılaştırılması. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2000; 6 (1-2): 81-8.
- Topal A. Veteriner Anestezi. Birinci Baskı. Bursa: Nobel&Güneş, 2005; s. 47-64.
- Yanmaz LE, Doğan E, Okumuş Z, Şenocak MG, Ersöz U, Okur S. Comparison of intranasal and intramuscular administration of zolazepam tiletamine combination in cats. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg 2017; 12(2): 124-9.
- Yaygingül R, Belge A. The comparison of clinical and cardiopulmonary effects of xylazine, medetomidine and detomidine in dogs. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2018; 65: 313-22.
- Zlateva N, Marinov G. Effect of three anesthetic protocols on the haematological indices in cats during ovariohysterectomy. MedInform (Sofia) 2015; 2: 184-93.



Hasat Zamanının Meryemana Dikeninin (*Silybum marianum*) Kompozisyonuna, Gaz Üretimine, Metan Üretimine, Sindirimine ve Metabolik Enerjisine Etkisi *

Ahmet Aziz KURT¹, Adem KAMALAK¹

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kahramanmaraş-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Adem KAMALAK; akamalak@ksu.edu.tr; ORCID: 0000-0003-0967-4821

Atıf yapmak için: Kurt AA, Kamalak A. Hasat zamanının Meryemana dikeninin (*Silybum marianum*) kompozisyonuna, gaz üretimine, metan üretimine, sindirimine ve metabolik enerjisine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 116-120.

Özet: Bu çalışmanın amacı hasat zamanının Meryemana dikeninin kompozisyonuna, gaz üretimine, metan üretimine, metabolik enerjisine ve organik madde sindirim derecesine etkisini belirlemektir. Çalışmada elde edilen bulgulara göre, hasat zamanı Meryemana dikeninin kompozisyonunu, gaz üretimini, metan üretimini, metabolik enerjisini (ME) ve organik madde sindirim derecesini (OMSD) önemli derecede etkilemiştir. Meryemana dikeninin kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), ham yağ (HY), nötral deterjan fiber (NDF), asit deterjan fiber (ADF) içerikleri %11.99 ile 43.26, %12.68 ile 16.56, % 11.11 ile 15.77, % 2.47 ile 5.86, % 39.88 ile 60.85 ve % 24.96 ile 44.52 arasında değişmiştir. Meryemana dikeninin 24 saatlik fermentasyonu sonucu açığa çıkan gaz üretimi ve metan üretimi 26.36 ile 40.44 ml ve 3.26 ile 5.34 ml arasında değişmiştir. Meryemana dikeninin metabolik enerji içeriği ve organik madde sindirim derecesi hasat zamanına bağlı olarak 7.67 ile 8.70 MJ kg/KM ve %48.87 ile 64.40 arasında değişmiştir. Sonuç olarak, hasat zamanı Meryemana dikeninin besleme değeri üzerinde önemli bir faktördür. Hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin besleme değeri özellikle HP içeriği, ME ve OMSD düşmüştür. *In vitro* gaz üretim değerleri sonuçlarına göre Meryemana dikeninin anti-metanojenik özelliği olduğu bundan dolayı ruminantlarda enterik metan üretimini azaltmak için kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kimyasal kompozisyon, Meryemana dikenini, metabolik enerji, organik madde sindirim derecesi

Effect of Harvest Stage on Chemical Composition, Gas Production, Methane Production, Digestibility and Metabolisable Energy of Milk Thistle (*Silybum marianum*)

Summary: The aim of the current experiment was to determine the effect of harvesting stage on the chemical composition, gas production, methane production, metabolisable energy and organic matter digestibility of milk thistle. According to the findings, harvesting stage significantly affected the chemical composition, gas production, methane production, metabolisable energy and organic matter digestibility of milk thistle. Dry matter (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), ether extract (EE), nötral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) contents of milk thistle hay ranged from 11.99 to 43.26%, 12.68 to 16.56 %, 11.11 to 15.77 %, 2.47 to 5.86 %, 39.88 to 60.85% and 24.96 to 44.52% respectively. Gas production and methane production at 24 ranged from 26.36 to 40.44 ml and 3.26 to 5.34 ml respectively. Metabolisable energy and organic matter digestibility of milk thistle hay ranged from 7.67 to 8.70 MJ kg/KM and 48.87 to 64.40% respectively. As a conclusion, harvesting stage is an important factor on the nutritive value of milk thistle hay. Nutritive value especially crude protein, metabolisable energy and organic matter digestibility of milk thistle hay decreased with advancing maturity. Based on the *in vitro* gas production date, it was considered that milk thistle has a potential to mitigate the enteric methane production

Key words: Chemical composition, metabolisable energy, milk thistle, organic matter digestibility

Giriş

Ruminant rasyonlarının önemli bir kısmını oluşturan kaba yemler, hayvanlara enerji, protein ve mineral sağlamanın yanında dolgu maddesi olarak da önemli görevler üstlenmektedir. Rumende yemlerin fermentasyonunu sağlayan bakteriler, funguslar, protozoalar ve arkealar arasındaki dengeyi koruması kaba yemlerin mevcudiyetine bağlıdır. Rasyonda yeterli miktarda kaba yemin olmadığı durumlarda, rumen

fonksiyonunu etkin bir şekilde yerine getirememekte buna bağlı olarak bazı metabolik bozukluklar kendini göstermektedir. Dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de zaman zaman kuraklık veya başka nedenlerden dolayı kaba yem tedarik sorunu ortaya çıkmakta olup, bu durum ekonomik anlamda hayvansal üretimi etkilemektedir. Kaba yem temin sorununu çözmek için yurt dışından kaba yem ithal edildiği dönemler dahi olabilmektedir. Bu durum hayvansal üretim maliyetini önemli derecede yükseltmektedir. Oysa ülkemizin bir çok bölgesinde yer alan marjinal alanlarda yetişen, hayvanların direk olarak otlayamadığı dikenlerin dahi ruminantların kaba yem ihtiyacını karşılamak için kullanılabilmesi yapılan ön çalışma

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.02.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 05.05.2020

*Bu çalışma "Hasat Zamanının Meryem Ana Dikeninin (*Silybum marianum*) Kompozisyonuna, *In Vitro* Gaz Üretimine ve Metan Üretimine Etkisi" adlı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

larda görülmektedir (Kamalak ve ark., 2005; Özınan ve ark., 2017). Yol kenarları ile boş arazilerde yetişen ve 1-2 m kadar boylanabilen Meryemana dikeninin (*Silybum marianum*) uygun zamanda hasat edildiğinde, ruminantların kaba yem ihtiyacını karşılamak için kullanılabilceği bildirilmiştir (Malayoğlu ve ark., 2016; Nikzad ve ark., 2017; Özınan ve ark., 2017).

Bu çalışmanın, amacı hasat zamanının Meryemana dikenin kompozisyonuna, gaz üretimine, metan üretimine, metabolik enerjisine ve organik madde sindirim derecesine etkisini Wende analizi ve Hohenheim gaz üretim tekniğini kullanarak belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Çiçeklenme öncesi, çiçeklenme ve tohum bağlama dönemlerinde 10 farklı Meryemana dikenini hasat edilerek laboratuvara getirilmiş ve kurutulmuştur. Daha sonra örnekler 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülerek analizler için hazır hale getirilmiştir. Örneklerin kuru madde, ham kül, ham protein ve ham yağ içerikleri üç tekerrürlü olarak AOAC (1990) yöntemiyle belirlenmiştir. Örneklerin ADF ve NDF içerikleri ise Van Soest ve ark. (1991) yöntemiyle belirlenmiştir.

Örneklerin gaz üretimleri Hohenheim gaz üretim tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Menke ve ark., 1979). Yaklaşık 200 mg KM olacak şekilde Meryemana dikenini tartılarak 100 ml kapasiteli cam şırıngalara transfer edilmiştir. Daha sonra üzerine 30 ml tamponlanmış rumen sıvısı ilave edilerek 39 °C ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiştir. Üç farklı dönemde hasat edilerek elde edilen Meryemana dikenini otu 24 saatlik inkübasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon için gerekli rumen sıvısı % 60 yonca kuru otu ve % 40 kesif yemden oluşmuş rasyonla beslenen üç baş kanüllü koçtan alınmıştır. Bütün ünkübasyonlar üçer

nin ME ve OMSD değerleri Menke ve Steingass (1988)'ın aşağıda bildirdiği formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$ME \text{ (MJ/kg KM)} = 24.59 + 0.7984GÜ + 0.0496HP$$

$$OMSD \text{ (\%)} = 1.68 + (0.1418GÜ) + (0.073HP) + (0.217HY) - (0.028HK)$$

GÜ: Gaz üretimi (ml)

HP: Ham protein (%)

HY: Ham yağ (%)

HK: Ham kül (%)

İstatistik analizler

Hasat zamanının Meryemana dikeninin kompozisyonuna, gaz üretimine, metan üretimine, ME ve OMSD etkisini belirlemek için çalışmadan elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklar ise Tukey çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir. Analizler IBM SPSS Statistics 20 Paket Programı kullanılmıştır (IBM Cooperation, Somers, NY, USA).

Bulgular

Farklı zamanlarda hasat edilen Meryemana dikenin kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir. Meryemana dikenin KM içeriği %11.99 ile 43.26 arasında değişmiş olup en yüksek KM içeriği tohum bağlama döneminde hasat edilen Meryemana dikeninde bulunmuştur (P<0.001). Meryemana dikenin HK içeriği %12.68 ile 16.56 arasında değişmiştir ve en yüksek değeri çiçeklenme öncesinde hasat edilen Meryemana dikeninde bulunmuştur (P<0.001).

Tablo 1. Farklı zamanlarda hasat edilen Meryemana dikenin kompozisyonu

Parametreler	Hasat Zamanı				
	Çiçeklenme öncesi	Çiçeklenme	Tohum bağlama	SHO	P
KM	11.99 ^c	19.63 ^b	43.26 ^a	0.883	<0.001
HK	16.56 ^a	14.24 ^b	12.68 ^c	0.477	<0.001
HP	15.77 ^a	11.79 ^b	11.11 ^b	0.345	<0.001
HY	2.47 ^c	2.84 ^b	5.86 ^a	0.066	<0.001
NDF	39.88 ^c	54.84 ^b	60.85 ^a	0.467	<0.001
ADF	24.96 ^c	36.58 ^b	44.52 ^a	0.630	<0.001

^{a,b,c}. Aynı satırda yer alan farklı simgeye sahip ortalamalar birbirinden farklıdır, SHO= standart hata ortalaması, KM; kuru madde (%), HK: Ham kül (%), HP: Ham protein (%), HY: Ham yağ (%), NDF: Nötral deterjan fiber (%), ADF: asit deterjan fiber(%).

tekerrürlü olarak yapılmıştır. Fermentasyon tamamlandıktan sonra gaz ölçüm değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Meryemana dikeninin fermentasyon sırasında açığa çıkan gazın metan içeriği Infrared Metan Analiz cihazıyla (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany) belirlenmiştir (Goel, 2008). Meryemana dikenini

Meryemana dikenin HP içeriği % 11.11 ile 15.77 arasında olup en yüksek HP içeriği çiçeklenme öncesinde hasat edilen Meryemana dikeninde bulunmuştur (P<0.001). HY içeriği Meryemana dikeninde % 2.47 ile 5.86 arasında değişmiş olup en yüksek değeri tohum bağlama döneminde hasat edilen örnekler

göstermiştir ($P<0.001$). NDF içeriği % 39.88 ile 60.85 arasında olup en yüksek değere tohum bağlama döneminde hasat edilen örnekler sahip olmuştur ($P<0.001$). ADF içeriği % 24.96 ile 44.52 arasında değişmiş ve en yüksek ADF içeriği tohum bağlama döneminde hasat edilen örneklerde bulunmuştur ($P<0.001$).

Farklı zamanlarda hasat edilen Meryemana dikenin gaz üretimi, metan üretimi, ME ve OMSD Tablo 2'de verilmiştir. Hasat zamanı Meryemana dikenin gaz üretimi, metan üretimi, ME ve OMSD'ni önemli derecede etkilemiştir ($P<0.001$).

Tablo 2. Farklı zamanlarda hasat edilen Meryemana dikenin gaz üretimi, metan üretimi, metabolik enerji ve organik madde sindirim derecesi

Parametreler	Hasat Zamanı			SHO	P
	Çiçeklenme öncesi	Çiçeklenme	Tohum bağlama		
Gaz(ml)	40.44 ^a	36.12 ^b	26.36 ^c	0.770	<0.001
Metan (ml)	5.34 ^a	4.56 ^b	3.26 ^c	0.098	<0.001
Metan(%)	13.20 ^a	12.63 ^{ab}	12.38 ^b	0.233	<0.001
ME	8.70 ^a	8.07 ^b	7.67 ^c	0.099	<0.001
OMSD	64.40 ^a	58.26 ^b	48.87 ^c	0.711	<0.001

^{a,b,c} Aynı satırda yer alan farklı simgeye sahip ortalamalar birbirinden farklıdır, SHO= standart hata ortalaması, ME: metabolik enerji (MJ kg KM), OMSD: Organik madde sindirim derecesi (%).

Meryemana dikenin 24 saatlik fermentasyonu sonucu açığa çıkan gaz miktarı 26.36 ile 40.44 ml, metan üretimi 3.26 ile 5.34 ml arasında değişmiştir. En yüksek gaz ve metan üretimi çiçeklenme öncesi hasat edilen Meryemana dikeninde bulunmuştur ($P<0.001$). Meryemana dikeninin ME içeriği hasat zamanına bağlı olarak 7.67 ile 8.70 MJ kg/KM arasında değişmiş olup en yüksek değer çiçeklenme öncesi dönemde görülmüştür. Hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin metabolik enerji içeriği düşmüştür. Meryemana dikeninin OMSD'si hasat zamanına bağlı olarak %48.87 ile 64.40 arasında değişmiş olup en yüksek değere çiçeklenme döneminde sahip olmuş ve hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin OMSD'si düşmüştür ($P<0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Hasat zamanı Meryemana dikeninin sadece kompozisyonunu etkilemekle kalmamış aynı zamanda gaz üretimi, metan üretimi, ME ve OMSD'ni önemli derecede etkilemiştir ($P<0.001$). Yabani korunga ve *Polygonum aviculare* otlarıyla yapılan çalışmalarda hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte HK içeriğinin düştüğü bildirilmiştir (Kamalak 2010; Kaplan ve ark., 2014). Hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte otun HK içeriği ve HP içeriği azalmıştır. Yapılan birçok çalışmada hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte HP içeriğinde azalma teyit edilmiştir (Canbolat, 2012; Kamal ve ark., 2011; Kamal ve Canbolat 2010; Kaplan ve ark., 2014; Kaplan ve ark., 2016; Kara ve ark. 2018; Üke ve ark., 2017). Elde edilen kaba yemlerin HP içeriği yemlerin kalitesini belirleyen önemli bir

parametredir. Rumenin normal bir fonksiyon göstermesi için kullanılan yemin HP içeriğinin KM bazında %7-8 olması gerektiği bildirilmiştir (Van Soest, 1994). Tablo 1'den de görüldüğü gibi bu çalışmaya konu olan üç dönemde hasat edilen Meryemana dikenin protein içeriği rumenin minimum ihtiyacını karşılayacak seviyenin üzerinde protein içeriğine sahiptir.

Diğer taraftan hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin NDF ve ADF gibi hücre duvarı unsurlarında önemli artışlar olduğu bildirilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur (Canbolat, 2012; Kamal ve ark., 2011; Ka-

malak ve Canbolat 2010; Kaplan ve ark., 2014; Kaplan ve ark., 2016; Kara ve ark. 2018; Üke ve ark., 2017). Kısaca hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin KM, HY, NDF ve ADF içeriği önemli derecede artmasına rağmen HK ve HP içeriğinde önemli derecede azalma olmuştur. Bilindiği gibi kaba yemlerde bol miktarda bulunana NDF ve ADF içerikleri yemin tüketimini ve sindirimini etkileyen önemli bir unsurdur. Hücre duvarını oluşturan bu unsurların artmasıyla birlikte yemin tüketimi ve sindirimi düşmektedir. Dolayısıyla hasat zamanının ilerlemesi yemin besleme değerini düşürmektedir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi, hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin gaz üretimi, metan üretimi, metabolik enerji ve organik madde sindirim derecesini önemli derecede düşmüştür. Gaz ve metan üretiminde azalışın sebebi fermente olabilen yem miktarıyla ilişkilidir. Yem içerisinde fermente olabilen substrat ne kadar fazla ise o kadar fazla gaz ve metan üretimi oluşmaktadır. Gaz ve metan oluşumu yemlerde bulunan karbonhidratların fermentasyonu sonucu oluşmakta, yağ ve proteinlerin fermentasyonu sonucu oluşan gaz ve metan miktarı ise oldukça düşüktür (Makkar, 2004). Genel olarak yavaş fermente olan NDF ve ADF gibi hücre duvarı unsurların yem içerisinde artmasıyla birlikte gaz ve metan üretiminde azalmalar çok belirgin hale gelmektedir. Bu yüzden bu çalışmada gaz ve metan üretiminde meydana gelen azalma beklenen bir sonuç olup direk olarak fermente olan substrat miktarının NDF ve ADF içeriğinin artmasıyla birlikte azaldığı düşünülmektedir.

Ayrıca gaz üretimindeki düşüşün bir kısmından, hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte artan yağdan kaynaklanmış olabilir. Daha önceki yapılan *in vitro* çalışmalarda rasyonun yağ içeriği ile üretilen gaz arasında negatif bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir ((Canbolat, 2012; Kamalak ve ark., 2011; Kamalak ve Canbolat 2010; Kaplan ve ark., 2014; Kaplan ve ark., 2016; Kara ve ark. 2018; Üke ve ark., 2017). Unutulmamalıdır ki yemlerin fermentasyonunu olumsuz etkileyen tanen, saponin ve esansiyel yağlar gibi bazı anti-besinsel faktörler mevcut olduğu ve gaz ve metan üretimini azalttığı bildirilmiştir (Jayanegara ve ark., 2014; Patra ve Yu, 2012). Hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin metabolik enerji içeriği ve organik madde sindirim derecesi düşmüştür. Söz konusu parametrelerdeki azalmanın NDF ve ADF içeriğinin hasat zamana bağlı olarak artışından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada belirlenen metan içeriği %12.38 ile 13.20 arasında değişmiştir ve bu değer yonca gibi bir kaba yemin metan yüzdesiyle (%16-18) karşılaştırıldığında oldukça düşük gözükmemektedir. Başka bir ifadeyle yoncayla ikamesi durumunda daha az enterik metan üretiminin olabileceği yani anti-metanojenik özelliği olabileceği düşünülmektedir. Bu anti metanojenik özelliğinin kesin olup olmadığı *in vivo* deneylerle test edilmesi gereklidir.

Sonuç olarak, hasat zamanı, Meryemana dikeninin besleme değeri üzerinde önemli bir faktördür. Hasat zamanının ilerlemesiyle birlikte Meryemana dikeninin besleme değeri özellikle HP içeriği, ME ve OMSD düşmüştür. Meryemana dikenini uygun zamanda hasat edildiğinde ruminantların besin madde ihtiyacını karşılamak için önemli bir potansiyele sahip olduğu gözükmemektedir. Bununla birlikte geniş bir uygulamaya geçilmeden *in vivo* besi deneyleri yapılarak hayvanlar üzerinde muhtemel etkilerin belirlenmesi gerekmektedir. *In vitro* gaz sonuçlarına göre Meryemana dikeninin anti-metanojenik özelliğinden dolayı ruminantlarda enterik metan üretimini azaltmak için kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada Meryemana dikeninde bulunan olası anti besinsel faktörlerin analizi yapılmadığından, söz konusu unsurların gaz ve metan üretimine ne kadar etkisinin olduğunu kesin söylemek mümkün değildir. Bunun için daha fazla araştırmalara ihtiyaç olduğu aşikârdır.

Kaynaklar

- AOAC. Official Methods of Analysis. Fifteenth Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- Canbolat O. Potential nutritive value of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L) hay harvested at three different maturity stages. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18(2):331-5.

Goel G, Makkar HPS, Becker K. Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) seeds and their extract on partitioning of nutrients from roughage-and concentrate-based feeds to methane. Anim Feed Sci Technol 2008; 147(1-3): 72-89

Jayanegara A, Wina E, Takahashi J. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: Influence of addition levels and plant sources. Asian-Austral J Anim Sci 2014; 27(10): 1426-35.

Kamalak A, Atalay AI, Ozkan CO, Kaya E, Tatlıyer A. Determination of potential nutritive value of *Trigonella kotschi* Fenzl hay harvested at three different maturity stages. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17(4): 635-40.

Kamalak A, Canbolat O, Gurbuz Y, Erol A, Ozay O. Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L). Small Ruminant Res 2005; 58: 149-56.

Kamalak A. Determination of potential nutritive value of *Polygonum aviculare* hay harvested at three maturity stages. J Appl Anim Res 2010; 38: 69-71.

Kamalak A, Canbolat O. Determination of nutritive value of wild narrow-leaved clover (*Trifolium angustifolium*) hay harvested at three maturity stages using chemical composition and *in vitro* gas production. Trop Grassl 2010; 44: 128-33.

Kaplan M, Kamalak A, Ozkan CO, Atalay AI. Vegetasyon döneminin yabancı korunga otunun potansiyel besleme değerine, metan üretimine ve kondense tanen içeriğine etkisi. Harran Üniv Vet Fak Derg 2014; 3(1): 1-5.

Kaplan M, Üke Ö, Kale H, Yavuz S, Kurt Ö, Atalay AI. Olgunlaşma döneminin teff otunun potansiyel besleme değeri, gaz ve metan üretimine etkisi. Igdir Üni Fen Bilimleri Enst Der 2016; 6(4):181-6.

Kara K, Ozkaya S, Baytok E, Guclu BK, Aktug E, Erbas S. Effect of phenological stage on nutrient composition *in vitro* fermentation and gas production kinetics of *Plantago lanceolata* herbage. Vet Med 2018; 63(06): 251-60.

Makkar HPS. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resource. Samuel J. ed. In: Assessing Quality and Safety of Animal Feeds. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2004; pp.55-88.

Malayoğlu HB, Ozdemir P, Ipcak HH, Unlu B,

- Taghilloofar AH, Bayram B. Effect of ensiling milk thistle (*Silybum marianum* L Gaerth) with molasses or urea on silage quality and *in vitro* digestibility. VII International Scientific Agriculture Symposium. October,6-9 2016; Jahorina-Bosnia and Herzegovina.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they incubated with rumen liquor *in vitro*. J Agric Sci 1979; 92: 217-22.
- Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim Res Dev 1988; 28: 9-55.
- Nikzad Z, Chaji M, Mirzadeh K, Mohammadabadi T, Sari M. Effect of different levels of milk thistle (*Silybum marianum*) in diets containing cereal grains with different ruminal degradation rate on rumen bacteria of Khuzestan buffalo. Iran J Appl Anim Sci 2017; 7(3):401-09.
- Özinan L, Alatürk F, Gökkuş A. Meryemana dikenini (*Silybum marianum* L, Gaertner)'nin silaj olarak kullanım olanakları. Türk Tarım Doğa Bilim Der 2017; 4(1): 88-94.
- Patra AK, Yu Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of rumen microbial populations. Appl Environ Microb 2012; 78(12): 4271-80.
- Üke Ö, Kale H, Kaplan M, Kamalak A. Olgunlaşma döneminin kinoa (*Chenopodium quinoa* Wild)'da ot verimi ve kalitesi ile gaz ve metan üretimine etkisi. KSÜ Tarım Doga Derg 2017; 20(01): 42-6.
- Van Soest PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant. Second Edition, New York: Cornell University Press, 1994; p. 290.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74: 3583-97.



Sığır Eti ve İç Organlarında Zeranol Kalıntısının Araştırılması*

Tufan ATABAŞ¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ²

¹Kocasinan Tarım Orman İlçe Müdürlüğü, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Nurhan ERTAŞ ONMAZ; E-posta: nertas@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0002-4679-6548

Atıf yapmak için: Atabaş T, Ertaş Onmaz N. Sığır eti ve iç organlarında zeranol kalıntısının araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 121-125.

Özet: Bu çalışmada Kayseri'deki mezbahanelerde kesilen sığırlara ait et, karaciğer ve böbrek örneklerinde, zeranol kalıntı seviyelerinin Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, Kayseri ilindeki sığır kesimi yapılan birinci sınıf üç farklı mezbaha Ekim-Aralık 2018 tarihlerinde, 1 ay periyodik aralıklarla, üçer kere ziyaret edildi. Her ziyarette her bir mezbahadan rastgele seçilen hayvanlara ait 20 karaciğer, 20 böbrek ve 20 et örneği alınarak toplamda 180 örnek materyal olarak kullanıldı. Bu çalışmada, analiz edilen sığır doku örneklerinden 23 böbrek (%38.3), 20 karaciğer (%33.3) ve 17 (%28.3) et örneğinde zeranol kalıntısı tespit edildi. Sığır böbrek, karaciğer ve et örneklerinde kalıntı miktarı sırasıyla; 50.23 - 1120.61 ppt, 38.94-1057.96 ppt ve 32.29-1195.8 ppt arasında tespit edildi. Analiz edilen örneklerdeki zeranol kalıntısı Kodeks Alimentarius'ta belirtilen yasal limitin altında idi. Sonuç olarak, analiz edilen örneklerdeki zeranol kalıntı miktarları düşük bulunmuş olsa da zeranol içeren et tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği nedeniyle, gıda güvenliği kapsamında bu kimyasalın periyodik olarak izlenmesi gerektiği ortaya kondu.

Anahtar kelimeler: Böbrek, ELISA, et, karaciğer, zeranol

Investigation of Zeranol Residue in Meat of Cattle and Internal Organs

Summary: In this study, it was aimed to investigate the levels of zeranol residue in the meat, liver and kidney samples of cattle slaughtered in slaughterhouses in Kayseri by Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) method. For this purpose, three different first class slaughterhouses where cattle were slaughtered in Kayseri province were visited three times in October-December 2018 at 1-month periodic intervals. At each visit, 20 liver, 20 kidney and 20 meat samples belonging to the animals randomly selected from each slaughterhouse were taken and a total of 180 sample materials were used. In this study, zeranol residues were detected in 23 kidney (38.3%), 20 liver (33.3%) and 17 (28.3%) meat samples from the analyzed bovine tissue samples. The residual amount in beef kidney, liver and meat samples were detected between 50.23 - 1120.61 ppt, 38.94-1057.96 ppt and 32.29 - 1195.8 ppt, respectively. The zeranol residue in the analyzed samples was below the legal limit specified in Kodeks Alimentarius. In conclusion, although the amount of zeranol residues in the analyzed samples are low, it was concluded that consuming meat containing these residues may pose a risk to public health therefore, this chemical should be monitored periodically as a food safety measure.

Key words: ELISA, kidney, liver, meat, zeranol

Giriş

Dünyada hızla artan nüfus, gıda ihtiyacının karşılanması için önemli bir sorun haline gelmiştir. Özellikle hayvansal gıdaların günlük diyetle yeterli miktarda alınmaması çeşitli hastalıklara ve gelişme bozukluklarına neden olabilmektedir. Hayvansal gıdada artan talebi karşılamak için hayvanların besi durumu ve verimlerinin en ekonomik şekilde artırılması gündeme gelmiştir. Özellikle sığır yetiştiriciliğinde ağırlık artışı, yemden maksimum düzeyde faydalanabilme, yağ dokunun olabildiğince azaltılması ve kas dokunun artırılması gibi amaçlarla anabolik maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Anabolik maddelerin ticari olarak

kullanılmasıyla birlikte bu bileşiklerin tüketicilerin metabolizmasında oluşturduğu etkiler araştırma konusu olmuştur (Kayaalp, 1990; Kaya, 1991). Sonuçta besinlerde bulunan bazı anabolik madde kalıntılarının, çeşitli doku ve organlarda hasarlara, genotoksik ve karsinojenik etkilere, cinsiyet özellikleri ve davranış değişikliklerine, üreme bozukluklarına neden olabileceği ortaya konmuştur (Daxenberger ve ark., 2000; Botsoglou, 2000; Kaya ve Ünsal, 2002). Hormonal sistem başta olmak üzere sinir sistemi, deri, kemikler ve tüm organların anabolik maddelerden etkilenebileceği; sentetik analogların koroner kalp hastalıkları, peptik ülserler ve tümoral oluşumlara neden olabileceği belirlenmiştir (Awaya ve ark., 1998; Ergun, 2000; Meyer ve ark., 1991). Özellikle kadınlarda et tüketimindeki hormon maruziyetine ilişkin kanser riskinin artması, önemli bir sağlık riski olarak ön plana çıkmaktadır. Et tüketimi yoluyla anabolik maddelere

Geliş Tarihi/Submission Date : 10.03.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 05.05.2020

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7814 kodlu proje ile desteklenmiştir

maruz kalmanın insan sağlığı yönünden oluşturduğu riskler göz önüne alındığında tüketime sunulan hayvansal gıdalarda bu maddelerin tespiti önem kazanmaktadır (Kaya, 1991). Hayvan yetiştiriciliğinde canlı ağırlık artışı amacı ile kullanılan anabolizan maddelerden zeranol, hayvansal gıdalar aracılığı ile alındığında insanlarda hormonal, teratojenik, karsinojenik ve kemikte mineral gelişimi üzerine olumsuz etkilerinden dolayı Türkiye ve diğer birçok ülkelerde kullanımı yasaklanmıştır (Brambilla, 2000; Doyle, 2000; Terzi, 2005).

Bu çalışmada, Kayseri'deki mezbahanelerde kesilen sığırlara ait et ve iç organlarda östrojenik etkili bir anabolik olan zeranol kalıntı düzeylerinin Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Örnekleme

Bu çalışmada, Kayseri ilindeki sığır kesimi yapılan birinci sınıf üç farklı mezbaha Ekim-Aralık 2018 tarihlerinde, 1 ay periyodik aralıklarla, üçer kere ziyaret edildi. Her ziyarette her bir mezbahadan rastgele seçilen hayvanlara ait 20 karaciğer, 20 böbrek ve 20 et örneği olmak üzere toplamda 180 örnek materyal olarak kullanıldı. Toplanan örnekler soğuk zincirde laboratuvara götürüldü ve analizleri yapılmaya kadar -18°C'de muhafaza edildi.

Öneklerin hazırlanması

Öneklerin ekstraksiyon işlemi, kullanılan test kitindeki (RIDASCREEN® Zeranol, Art. No. R3301) et örnekleri için önerilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Mezbahalardan temin edilen et, karaciğer ve böbreklerin yağsız kısımlarından alınan örnekler iyice parçalandı. Parçalardan alınan her 1 g örnek üzerine 1 mL 20 mM PBS buffer ilave edildi ve 5 dk vortekslenildi. Elde edilen homojenizata 10 mL tert.- bütülmiteleler eklendi ve 30 dk boyunca çalkalayıcıda (N-Biotek, Kore) karıştırıldıktan sonra 10-15°C de 4000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kuruyana kadar 60°C de buharlaştırıldı. Kalıntı üzerine 1 mL kloroform ve 3 mL 1M NaOH ilave edildikten sonra 30 s vortekslenerek 10-15°C de 4000 g'de 10 dk santrifüj edildi. NaOH fazı (üstte kalan sulu tabaka) 250 µl asetik asit (%96) içeren başka bir santrifüj tüpüne aktarılıp 5 mL tertbutülmiteleler ile karıştırılarak 10-15°C de 4000 g'de 10 dk santrifüj işleminden sonra örnekler -25°C'de yaklaşık 60 dakika alt faz donana kadar beklendi. Süpernatant başka bir santrifüj vidalı kapaklı şişeye aktarılarak 60°C'de uçuruldu ve kalıntı, 2 mL numune seyreltme tamponu içinde çözündürüldü.

Ekstraktların kolondan geçirilmesi

Seyreltme tampon çözeltisinde çözündürülen ekstrakt RIDA C18 kolondan (r-biopharm, Art No: R2002, Al-122

many) geçirildi. Bu amaçla, 3 mL saf metanol ile yıkanan ve sonrasında 2 mL metanol/Tris-HCl (pH 8.5, 20/80 v/v) dengelenen kolona 3.5 mL örnek eklendi. Kolon 2 mL metanol/Tris-HCl ve takiben 3 mL metanol/Tris-HCl (40/60 v/v) ile yıkandıktan sonra içerisindeki sıvı pozitif basınç ile uzaklaştırıldı. Ayrıştırılan örnek 1 mL methanol/distile su (80/20 v/v) içeren bir tüpe aktararak ve 60°C'de düşük akışlı azot gazı altında evapore edildi. Kurutulan kalıntı 1 mL örnek tampon çözeltisinde çözündürüldü.

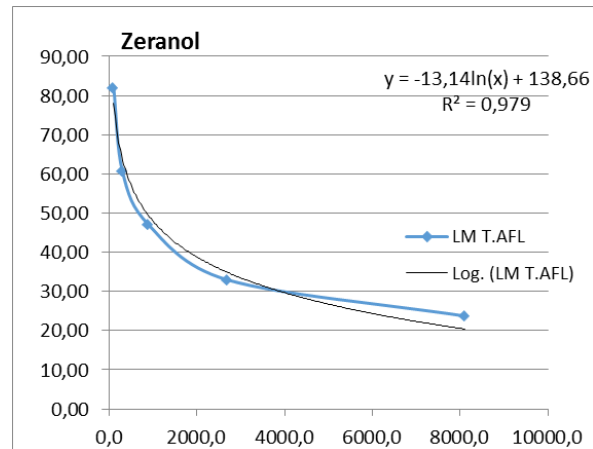
ELISA prosedürü

Mikrotitre plakasındaki her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş antikor eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında, pleytler 250 µL yıkama tampon (Fosfat tampon çözeltisi-Tween, PBS-tween) ile 3 kez kuyucuklar yıkandı. Zeranol standart solüsyon ve hazırlanan örneklerden 20'şer µL alınarak her biri ayrı kuyucuklara eklenerek üzerlerine 100 µL seyreltilmiş konjugat ilave edildi ve 22°C'de 30 dk inkübasyondan sonra 3 kere yıkandı. Yıkama işlemi takiben, her bir kuyucuğa 100 µL substrat/kromojen eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyon eklenerek ELISA otomatik okuyucuda (Thermo, Finlandiya) 450 nm'de okutulmuş elde edilen absorbanslar kaydedildi.

Çalışmada örneklerin zeranol kalıntı düzeylerinin hesaplanmasında, RIDA SOFT Win (Art no:Z9996) Programı kullanıldı. Zeranol kalıntı miktarı hesaplanırken kalibrasyon eğrisi üzerinden elde edilen konsantrasyonlar, 2 olarak belirlenen dilüsyon faktörü ile çarpıldı.

Bulgular

Çalışmada, ELISA analizinde, zeranol kalıntı düzeylerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan standartların absorbans değerleri Tablo 1'de kalibrasyon eğrisi ile Şekil 1'de belirtildi.



Şekil 1. Zeranol analizi için ELISA 'da kalibrasyon eğrisi (0-8.100 ppt)

Tablo 1. Zeranol tespit analizinde kullanılan standartların absorpsiyon değerlerine göre elde edilen referans aralıkları

Standart	Konsantrasyonları (ng/L)	Ortalama Absorpsiyon değeri	% Standart Sapma (SS)	% CV	% B/B0
1	0.0	2.0798	0.009	1.6	100.00
2	100.0	1.7069	0.008	1.2	82.07
3	300.0	1.261	0.009	1.4	60.63
4	900.0	0.9772	0.008	2.0	46.99
5	2700.0	0.6852	0.009	9.2	32.95
6	8100.0	0.4936	0.006	2.0	23.73

CV: coefficient of variability, % B/B0: % Standart ya da örneğin absorpsiyonu /Standart₀'ın absorpsiyonu

Analiz edilen 60 et örneğinin 17'sinde (%28.3), 60 karaciğer örneğinin 20'sinde (%33.3) ve 60 böbrek örneğinin 23'ünde (%38.3) zeranol kalıntısı tespit edildi. Et örneklerindeki zeranol kalıntı düzeyleri; 32.29-1195.8 ppt, karaciğer örneklerinde 38.94-1057.96 ppt, ve böbrek örneklerinde ise 50.23 – 1120.61 ppt düzeylerinde saptandı. Çalışmada, analiz edilen karaciğer, böbrek ve et örneklerindeki zeranol kalıntı düzeyleri dağılımları ile yüzdeleri Tablo 2'de belirtildi.

kullanımının yasak olduğu bildirilmektedir (Anonim 2019).

Bu çalışmada sığır et örneklerinin 17(%28.3)'sinde 5032.29 -1195.8 ppt düzeylerinde zeranol kalıntısı belirlendi. Benzer şekilde, Oruç ve ark., (2007) analiz ettikleri 81 sığır eti örneğinin 2'sinde 456.7 ng/kg ve 1501.3 ng/kg aralığında, Şevik ve Ayaz (2017) 200 adet sığır eti örneğinde 100.94 ppt ile 614.06 ppt arasında ve Sever ve ark. (2012) ise 51 et örneğinin

Tablo 2. Çalışılan sığır doku örneklerinde zeranol kalıntı düzeyleri (%)

Örnek	Tespit edilen düzey (ppt)/ (%)					CA'a göre maksimum limit (µg/kg)	TGK
	<100	101-200	201-300	301-500	>500		
Et (n=60)	13 (21.6)	3 (5)	-	-	1 (1.6)	2	Bulunmamalı
Karaciğer (n=60)	11 (18.3)	6 (10)	1 (1.6)	1(1.6)	1(1.6)	10	Bulunmamalı
Böbrek (n=60)	8 (13.3)	6 (10)	3 (5)	4 (6.6)	2(3.3)	-	Bulunmamalı

CA: Codex Alimentarius, TGK: Türk Gıda Kodeksi

Çalışmada incelenen örneklerdeki zeranol kalıntı düzeylerininCodex Alimentarius'ta sığır dokuları için belirtilen maksimum kalıntı limitin altında olduğu tespit edildi. Böbrek örnekleri için ise herhangi bir limit belirtilmemiştir (Tablo 1). Türk Gıda Kodeksi, "Gıda Değeri Olan Hayvanlara Uygulanması Yasaklanan ve Belli Şartlara Bağlı Hormon ve Benzeri Maddeler Hakkında Tebliğ"ne göre ise, zeranol anabolik etki amacıyla uygulanması yasak maddeler içerisinde bulunmamaktadır.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, daha önce yapılan bazı araştırmalarda da (Mor ve ark., 2011; Nazlı ve ark., 2005; Oruç ve ark., 2007; Şevik ve Ayaz, 2017; Uzunov ve ark., 2013) kullanılan ELISA tekniği ile Kayseri ilindeki mezbahalarda kesilen sığır doku örneklerindeki zeranol kalıntı düzeylerinin halk sağlığı açısından önemi değerlendirildi. Kodeks Alimentarius'ta (Anonim, 1996) zeranol'ün günlük kalıntı miktarının insan gıdaları için 0.5 ppb'yi, sığır karkasında 2ppb'yi ve sığır karaciğerinde 10 ppb'yi geçmemesi gerektiği bildirilmiştir. Gıda değeri olan hayvanlara uygulanması yasaklanan ve belli şartlara bağli hormon ve benzeri maddeler hakkındaki tebliğ'de ise zeranol

%29.3'unda 200-694 ng/kg arasında zeranol kalıntısı bulunduğunu, bulunan miktarların bildirilen tolerans düzeyinin aşağısında olduğunu rapor etmişlerdir. Nazlı ve ark. (2005) bu çalışmadan farklı olarak, analiz ettikleri 60 et ve et ürünü örneğinin tamamında zeranol kalıntısı belirlemiş ve 9 (%15) örnekteki kalıntı miktarının 2µg/kg'ın üzerinde olduğunu vurgulamışlardır.

Akıllı (1996) incelediği 300 sığır etinin 5 (%1.7)'inde 39.73-279.8 ng/kg düzeylerinde, Kart ve ark. (2008) ise analiz ettikleri 70 et örneğinin 4 (%5.72)'ünde 100 -110 ng/kg düzeylerinde zeranol kalıntısı bildirmişlerdir. Uzunov ve ark. (2013) Makedonya'nın 11 farklı şehrinden topladıkları 86 et örneğinde zeranol kalıntı düzeylerinin ilgili ülkenin yasal sınırlarının altında olduğu rapor etmişlerdir.. Yine, Mor ve ark. (2011) analiz ettikleri et örneklerinin 11 (%36.6)'inde 102-433 ng/kg düzeyinde zeranol kalıntısı tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacıların (Akıllı, 1996; Kart ve ark., 2008) rapor ettikleri kalıntı düzeyleri bu çalışma sonuçları ile kıyaslandığında nispeten düşük bulunmuştur..

Öte yandan Mısır'da Sadek ve ark.(1998) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada analiz edilen et örnekle-

rinde zeranol kalıntısına rastlanılmadığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada, 23 böbrek (%38.3) ve 20 karaciğer (%33.3) örneğinde sırasıyla; 50.23 - 1120.61 ppt, 38.94 - 1057.96 ppt düzeylerinde zeranol kalıntısı tespit edildi. Benzer şekilde, Nazlı ve ark. (2005) analiz ettikleri 30 sakatat numunesinin tamamında 0.01-6.00 µg/kg aralığında, Özkurt ve ark. (2007) 19 dana karaciğer örneğinin 8 (%42)'inde 30-80 ng/kg, 19 böbrek örneğinin ise 1 (%5.2)'inde 10 ng/kg düzeylerinde ve Liman ve ark (2005) ise, 84 böbrek örneğinin 5 (%5.95)'inde 300-500 ng/kg arasında zeranol bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yine, Mor ve ark. (2011) inceledikleri karaciğer örneklerinin (%96.6)'unda 101-358 ng/kg düzeyinde; böbrek örneklerinin tamamında 104-366 ng/kg düzeyinde zeranol kalıntısı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmalarla (Nazlı ve ark., 2005; Akıllı, 1996; Kart ve ark., 2008; Liman ve ark., 2005; Özkurt ve ark., 2007) bu çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar; örnekleme, örnek sayısı, numunenin temin edildiği hayvanlar ve farklı ekstraksiyon metodlarından kaynaklanabilir. Anabolik ajanların yasadışı kullanımında, varlığını belirlemek zordur, nitekim verilen anabolik ajanların miktarı, formülasyonu, süresi, metodu ve uygulama alanı bilinmemektedir.

Türk Gıda Kodeksinde (Anonim, 2019) zeranolün hayvanlara uygulanmasının yasak olduğu belirtildiği halde, bu çalışmada analiz edilen örneklerin yarısında tespit edilebilir düzeyde zeranol bulunması; besi sığırlarında zeranol'ün belli oranlarda kullanıldığını ve bu hayvanlardan elde edilen ürünlerin tüketime sunulduğunu göstermektedir. Bu durum halk sağlığı riski oluşturabilir. Bu çalışma ve daha önceki yapılan çalışmalardan (Liman ve ark., 2005; Mor ve ark., 2011; Nazlı ve ark., 2005; Özkurt ve ark., 2007; Sever ve ark., 2012) elde edilen veriler, Türkiye'de halen anabolik ajanların kullanıldığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada Kayseri'den toplanan sığır doku örnekleri (karaciğer, böbrek ve et) üzerinde yapılan analizler sonucunda Türk Gıda Kodeksi, "Gıda Değeri Olan Hayvanlara Uygulanması Yasaklanan ve Belli Şartlara Bağlı Hormon Ve Benzeri Maddeler Hakkında Tebliği" nde yasak olmasına rağmen örneklerin belirli düzeylerde zeranol kalıntısı içerdiği tespit edildi. Zeranol kalıntı miktarları düşük bulunmuş olsa da bu kalıntıları içeren et tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği kanısına varıldı. Et ve hayvanı kaynaklı diğer gıdalarda bulunan anabolik madde kalıntılarının, tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği gıda güvenliği otoritelerinin yaptıkları epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konmuştur. Hayvancılıkta çeşitli amaçlar için kullanılan anabolik ajanlar kalıntı bırakma eğilimindedir. Bu nedenle, gıda üretiminde kullanılan hayvanların idrar veya dışkıda ve kesimden sonra dokularda

hassas yöntemlerle periyodik anabolizan kontrollerinin düzenli olarak gerçekleştirilmesi, halk sağlığı açısından kritik bir öneme sahiptir.

Teşekkür

TYL-2017-7814 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Akıllı A. Gıdalarda veteriner ilaç ve anabolizan maddelerin kalıntı düzeylerinin tespiti. Gıdalarda katkı, kalıntı ve bulaşanların izlenmesi. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü Yayınları 1996.

Anonim. Residues Of Veterinary Drugs In Foods. Codex Alimentarius Maximum Residue Limits (MRLs) And Risk Management Recommendations (RMRs) For Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL 2-2018, 1996.

Anonim. Canlı Hayvanlar Ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik, 17 Aralık 2011, Sayı: 28145. Erişim Tarihi: 18.04.2019.

Awaya W, Lone KP, Hasain A, Dashti B, Al-Zenki S. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbant assay and a comparison with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Food Chem 1998; 63(4): 563-9.

Botsoglou NA. Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis. New York: Marcel Decker Incorporated, 2000; pp: 203-6.

Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macri A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. Toxicol Lett 2000; 114(1-3): 47-53.

Daxenberger A, Lange IG, Meyer HHD. Detection of anabolic residues in misplaced implantation sites in cattle. J AOAC Int 2000; 83(4): 809-19.

Doyle ME. Human Safety of Hormone Implants Used to Growth Promotor in Cattle. A review of scientific literature. FRI Briefings, Food Research Institute, UWMadison 2000; 1-24.

Ergun H. Hormon ve hormon benzeri anabolik ajanlar. Ankara Univ Vet Fak Derg 2000; 35: 353-63.

Kart A, Elmali M, Yapar K, Yaman H. Occurrence of zeranol in ground beef produced in Kars, Turkey. J Anim Vet Adv 2008; 7: 630-2.

- Kaya S, Ünsal A. Besinlerde İlaç Kalıntıları ve Denetimi. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A Eds. In: Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji. Ankara: Medisan Yayın Evi, 2002; pp. 737-68.
- Kaya S. Gelişmeyi Hızlandırıcı Maddeler. Şanlı Y, Kaya S eds. In: Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım Seçenekleri. Ankara: Medisan Yayınevi, 1991; pp. 544-50.
- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Pelikan Yayınevi, 1990; s. 2626-47.
- Liman BC, Eraslan G, Kanbur M, Hismiogulları SE, Seybek N, Alan A. Zearalenone and ochratoxin residues in the kidney of bulls. Indian Vet J 2005; 2: 615-7.
- Meyer HD, Rinko L, Dürsch L. Residue screening for the β -agonist clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using EIA and HPLC. J Chromatogr 1991; 564: 551-6.
- Mor F, Şahindokuyucu F, Kav K, Köker A. Sığırların doku örneklerinde zeranol ve trenbolon kalıntılarının belirlenmesi. Eurasian J Vet Sci 2011; 27(4): 235-9.
- Nazlı B, Çolak H, Aydın A, Hampikyan H. The presence of some anabolic residues in meat and meat products sold in Istanbul. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29(3): 691-9.
- Oruç HH, Cengiz M, Bağdaş D, Uzunoğlu İ. Sığır etlerinde zeranol, dietilstilbestrol, klenbuterol, 17 β -östradiol ve testosteron kalıntıları. J Res Vet Med 2007; 26(1-2): 11-5.
- Özkurt GB, Karagül H, Çelik S, Ünal N, Pekcan M, Sel T. Determination of zeranol residues and the serum testosterone oestrogene and progesterone levels in lambs around Ankara region. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2007; 54: 7-10.
- Sadek IA, Ismail HM, Salam HN, Salem M. Survey of hormonal levels in meat and poultry sold in Alexandria. Egypt East Mediterr Health J 1998; 4: 239-43.
- Sever E, Okumuş B, İnce S. Erzurum yöresinde satışı sunulan kırmızı etlerde 17 β östradiol, dietilstilbestrol ve zeranol kalıntılarının araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18(2): 267-72.
- Şevik SE, Ayaz ND. Sığır etlerinde hormon kalıntısı varlığının araştırılması. Vet Hekim Der Derg 2017; 88(1): 13-20.
- Terzi G. Kasaplık hayvanlarda zeranolün anabolizan olarak kullanımı ve önemi. Anadolu Üni Bil Tek Derg 2005; 6 (1): 27-36.
- Uzunov R, Hajrulai-Musliu Z, Dimitrievska-Stojkovic E, Stojanovska-Dimzoska B, Sekulovski P, Stojkovski V. Use of ELISA for preliminary screening of 19 nortestosterone anabolic steroid in cattle meat in Republic of Macedonia. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(1): 173-7.



Gümüş@Grafen Oksit Nanokompozitin Biyolojik Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Fatih Doğan KOCA

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Fatih Doğan KOCA; fatihkoca@gmail.com; ORCID: 0000-0001-9774-3019

Atif yapmak için: Koca FD. Gümüş@Grafen oksit nanokompozitin biyolojik sentezi ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(2):126-130.

Özet: Endüstride yaygın bir şekilde kullanılan nanopartiküller (NP'ler) grafen ve kitosan gibi maddelerle modifiye edilerek hidrofilitesi ve oksidasyon kapasitesinin artması yönüyle yeni özellikler kazanabilmektedir. Bu çalışmada *Syzygium aromaticum* özütü ile AgNP sentezinden farklı olarak, gümüş grafen oksit nanokompozitler (Ag@GO NK) sentezlenerek karakterizasyonu değerlendirilmiştir. Elde edilen Ag@GO NK'nin *Staphylococcus aureus* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *S. aromaticum* tabanlı Ag NP'lerin kısa süreli stabiliteye sahip olduğu (-16.1 mV) belirlenmiştir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi ile NP'lerin yaklaşık 327 nm etkin çapa sahip olduğu tespit edilmiştir. Sırayla X Işınları Toz Difraksiyon (XRD) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile NP'lerin kristal yapısı ve NP sentezinde işlevsel özelliğe sahip fonksiyonel grupların varlığı gösterilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Ag@GO NK'lerin morfolojileri incelenmiştir. Ag@GO NK'lerin *S. aureus* suşuna karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışma, *S. aromaticum* tomurcuk özütü ile Ag@GO NK'lerin biosentezi ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi açısından özgün ve yenilikçidir. Çalışmada elde edilen verilerin NP'lerin modifiye edilerek biyomedikal çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, biyolojik sentez, gümüş@grafen oksit

Biosynthesis of Silver@Graphene Oxide Nanocomposite and Determination of It's Antimicrobial Activity

Abstract: Nanoparticles (NPs), which are widely used in the industry, can be modified with materials such as graphene and chitosan to gain new properties in terms of their hydrophilicity and oxidation capacity. In this study, unlike Ag NP synthesis via *Syzygium aromaticum* extract, silver graphene oxide nanocomposites (Ag@GO NC) were synthesized different from Ag NP synthesis via *Syzygium aromaticum* extract and characterized. The antimicrobial activity of Ag@GO NC against to *Staphylococcus aureus* was tested. As a result of characterization studies, *S. aromaticum* based Ag NPs have short-term stability (-16.1 mV). Dynamic light scattering (DLS) analysis showed effective diameter of NPs is approximately 327 nm. X-Ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis showed that the crystallinity of NPs and the presence of functional groups in NP synthesis process, respectively. Ag@GO NCs were recorded by Scanning Electron Microscopy (SEM). Ag@GO NCs have been reported to have antimicrobial properties against *S. aureus* strain. The study is original and innovative in terms of biosynthesis and determining the antimicrobial activities of Ag@GO NCs with *S. aromaticum* bud extract. It is thought that the data obtained in this study will shed light on the studies in biomedical fields by modifying NPs.

Keywords: Antimicrobial activity, green sytnthesis, silver@graphene oxide

Giriş

Nanopartiküller (NP) 100 nm'den daha küçük boyuta sahip olmaları nedeni ile geniş yüzey alanlarına sahip olup atom benzeri özellikler sergilemektedir (Sangeetha ve ark., 2011). Eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ile bulk formlarından farklı özelliklere sahiptirler (Ghaedi ve ark., 2015). NP'lerin sentezinde kullanılan her bir yöntem (fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler) çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. NP'lerin sentezinde indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak organik moleküllerin (enzim, polisakkarit, bitki, alg

ve mantar gibi) kullanılmasını içeren biyolojik sentez, ikincil bir kimyasal madde kullanılmaması ve dolayısıyla ikincil bir kimyasal atık oluşmaması, nispeten kolay ve ucuz olması özellikleri ile ilgi çekmektedir (Sintubin ve ark., 2012; Ocsoy ve ark., 2018; Strayer ve ark., 2016; Shi ve ark., 2014). Çeşitli metalik NP'ler endüstriyel olarak potansiyel uygulama alanlarına sahiptir. Gümüş (Ag) NP'lerin antikanser, antimikrobiyal, çinko oksit (ZnO) NP'lerin kozmetik ve kaplama, pallyum (Pd) NP'lerin biyokatalitik ve Altın (Au) NP'lerin DNA etiketleme alanlarında uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Mittal ve ark., 2013). *Rhamnus virgata* yaprak özütü ile sentezlenen demir oksit NP'lerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, *Ruellia tuberosa* yaprak özütü ile sen-

tezlenen demir oksit NP'lerin kristal viyole boyasına karşı fotokatalitik aktivite gösterdiği, *Dodonaea viscosa* yaprak özütü ile sentezlenen Ag NP'lerin antimikrobiyal ve antikanser özellik sergilediği belirlenmiştir (Abbasi ve ark., 2019; Vasantharaj ve ark., 2019; Anandan ve ark., 2019).

Metalik NP'lerden Ag NP, sağlık sektörü, tekstil, sensör ve katalitik alanlarda uygulama özelliklerine sahiptir (El-Nour ve ark., 2010). Yasir ve ark., (2017) *Syngonium podophyllum* özütü ile sentezledikleri Ag NP'lerin antikandidal, Behravan ve ark., (2019) *Berberis vulgaris* özütü ile sentezledikleri Ag NP'lerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. *Areca catechu* ve *Andean Mortiño* özütü ile sentezlenen Ag NP'lerin metilen mavisi boyasına karşı katalitik aktivite sergilediği kaydedilmiştir (Vinay ve Chandrasekhar 2019; Kumar ve ark., 2019).

Daha önce *S. aromaticum* yaprak ve tomurcuk özütü ile sentezlenmiş Ag NP'ler ve uygulamaları ile ilgili çok sayıda çalışmalar mevcuttur (Vijayaraghavan ve ark., 2012; Venugopal ve ark., 2017; Kaur ve ark., 2013; Rajesh ve ark., 2018; Bansal ve ark., 2018; Ajitha ve ark., 2019). Bununla birlikte başka bir çalışmada *S. aromaticum* yaprak özütü ile sentezlenen gümüş grafen oksit (Ag@GO) NK'lerin Hg⁺² sensor ve katalitik etkinliği belirlenmiş olup (Sahu ve ark., 2019), *S. aromaticum* tomurcuk özütü ile Ag@GO NK sentezine ve antimikrobiyal etkisinin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada *S. aromaticum* tomurcuk özütü ile ilk kez Ag@GO NK'ler çevre dostu yöntemle sentezlenerek karakterize edilmiş ve antimikrobiyal aktivitesi izlenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Ag NP'nin sentezi

NP sentezinde indirgeyici ve kaplayıcı malzeme olarak kullanılan *S. aromaticum* ticari aktardan temin edilmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra etüvde 70 °C'de kurutulmuş *S. aromaticum* örneklerinden 10 g alınmış ve 100 ml distile su içerisinde bir saat süre ile demlenmiştir. Daha sonra Whatman No1 filtre kağıdı ile süzülen 10 ml özüt, 90 ml AgNO₃ solusyonu ile (5x10⁻³ M) renk değişimi gözlenene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak Ag NP'ler elde edilmiş ve GO ile bağlanması amacıyla kullanılmıştır.

Ag@GO NK'nin sentezi

Ag@GO NK sentezi için 2 ml, 5 mM Ag NP solusyonu ve 2 ml *S. aromaticum* özütü, 0.1 mg/mL (2 ml GO) çözeltisine eklenerek beherde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. GO ile bağlanmanın gerçekleştirilebilmesi amacıyla iki farklı NaCl çözeltisi hazırlanmıştır. Karışım esnasında solusyonun üzerine 2,4 ml NaCl (0.09 M) eklenmiş ve hemen ardından 5 ml NaCl (0.29 M) çözeltisi eklenerek karıştırma işlemi yaklaşık 30 dk devam etmiştir. Karıştırma işle-

minin ardından dolusyon santrifüjlenerek (5 dk, 3000 rpm) Ag@GO kompozitler elde edilmiştir. Sentezlenen NK'ler aynı santrifüj koşullarında distile su ile yıkanmış ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Ag@GO NK'nin karakterizasyonu

S. aromaticum özütü ile sentezlenen nano yapıların karakterizasyon çalışmaları Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM) ve Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezinde (ERNAM) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nano yapıların etkin çapı Dinamik Işık Saçılımı (DLS), yüzey yükü Zeta, kristal yapısı X Işınları Toz Difraksiyon (XRD), yapısına katılan organik moleküllerin varlığı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiş olup, ayrıca NK'ler SEM görüntüleri ile analiz edilmiştir.

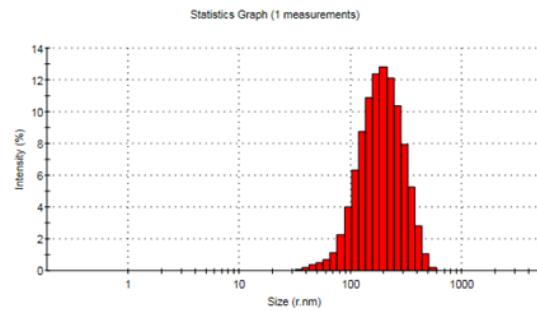
Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Ag@GO NK'lerin *Staphylococcus aureus* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Kısaca steril bir eküvyonla alınan koloniler 3 ml serum fizyolojikte süspende edilerek McFarland 0.5 (108 mikroorganizma/ml)'e göre ayarlanmış disklerle 25 µl emdirilmiştir. Bakteriler Mueller-Hinton agar besiyerine ekilmiş ve kurutulan diskler (37°C'de) agar yüzeyine yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında inhibisyon zonları belirlenmiştir.

Bulgular

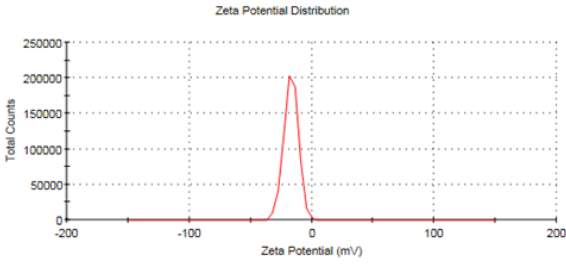
Ag@GO NK'nin karakterizasyonu

Elde edilen solusyondaki Ag NP'lerin etkin çapı DLS analizi ile yaklaşık olarak 327 nm olarak belirlenmiş olup Şekil 1'de gösterilmiştir.



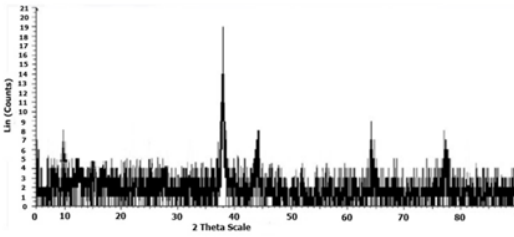
Şekil 1. Ag NP'lerin DLS analizi

S. aromaticum özütü ile sentezlenen Ag NP'lerin yüzey yükü zeta analizi ile -16.1 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Ag NP'lerin yüzey yükü

Şekil 3'te görüldüğü üzere XRD analizi ile NP'lerin yapısında 2θ düzleminde 10° , 38° , 44° , 64° ve 77° pikler gözlenmiştir. NP'lerin yapısına katılan fonksiyonel grupların varlığı FT-IR analizinde 3415, 2923,

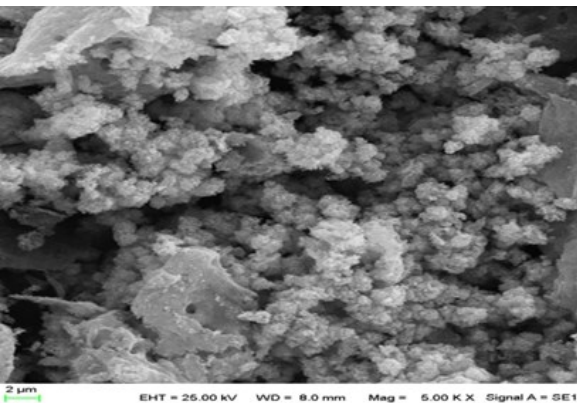


Şekil 3. Ag NP'lerin XRD analizi 2845, 1628 ve 1404 cm^{-1} 'de kaydedilen pikler ile belirlenmiştir (Şekil 4).

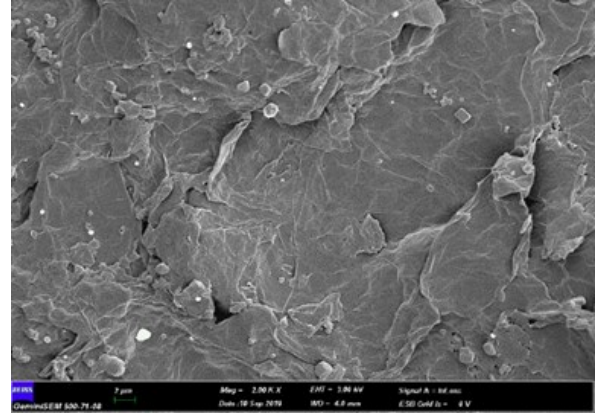


Şekil 4. Ag NP'lerin FT-IR analizi

Biyosentezi gerçekleştirilen Ag NP ve Ag@GO NK'lerin SEM analizleri sırayla Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir. Şekil 5'ten görüleceği üzere NP'ler morfolojileri



Şekil 5. Ag NP'lerin SEM resimleri

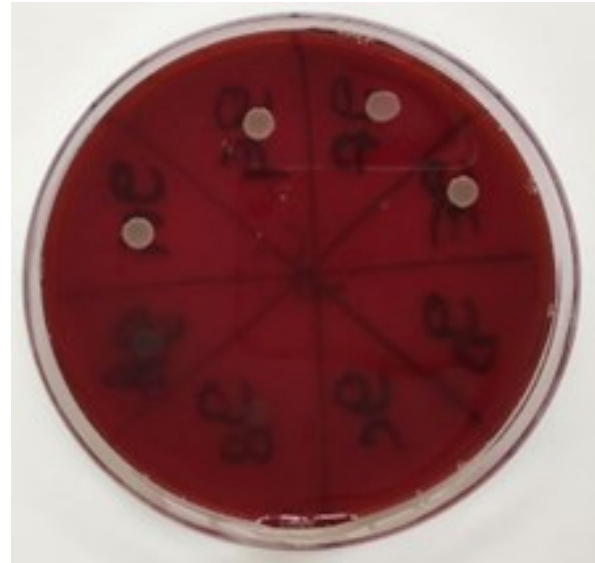


Şekil 6. Ag@GO NK'lerin SEM resimleri

yuvarlak yapıda ve yaklaşık 63 nm boyuta sahiptir.

Ag@GO NK'nin Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Ag@GO NK'nin *S. aureus* suşuna karşı konsantrasyon bağımlı olarak antimikrobiyal aktivite sergilediği kaydedilmiştir (Şekil 7). Biyolojik sentezlenen nano boyuta sahip kompozitin *S. aureus*'a karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) 6.25 ppm olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Ag@GO NK'nin *S. aureus* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi

Tartışma ve Sonuç

Ag@GO NK'nin karakterizasyonu

NP'lerin asidik ortamda sentezlenmesi neticesinde biraraya gelerek kümelenme eğiliminde oldukları ve bu nedenle etkin çaplarının yüksek olduğu bildirilmiştir (Armendariz ve ark., 2004). Daha önce bitki özütleri ile sentezlenen NP'lerin etkin çaplarının bizim veri-

lerimizle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Yuvakkumar ve ark., 2014). Negatif yönde düşük yüzey yükü ile partiküller arasında oluşan itme kuvveti partiküllerin kümelenmesini önlemekte olup, NP'nin kararlılığına işaret etmektedir (Sankar ve ark., 2014; Harshiny ve ark., 2015). Bu veriler ışığında sentezlenen Ag NP'nin yüzey kısa süreli kararlı yapıda olduğunu söylemek mümkündür. XRD analizi ile 2θ düzleminde gözlenen 10°, 38°, 44°, 64° ve 77° pikleri sırasıyla (0 0 1) (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) ve (3 1 1) düzlemine karşılık gelmektedir. XRD analiz ile elde edilen piklerle NK'nin yapısında Ag'nin varlığı doğrulanmış ve kristal yapısı belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Some ve ark., (2019) ve Hsu ve Chen (2014) biyosentezini gerçekleştirdikleri Ag@GO NK'lerin kristal düzlemini (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) ve (3 1 1) olarak belirlemiş olup, çalışmamızla uyum içinde olduğu görülmüştür. *S. aromaticum* özütünün indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak kullanılması ile biyolojik olarak sentezlenen NP'lerin yapısına katılan fonksiyonel grupların varlığı FT-IR analizi ile incelenmiştir. Bu test sonucunda 3415, 1628 ve 1404 cm⁻¹'de gözlenen pikler sırası ile alkol (O-H), alken (C=C) ve aromatik (C=C) gruplarına karşılık gelmektedir. 2923 ve 2845 cm⁻¹'de gözlenen pikler alkan gruplarına (C-H) işaret etmektedir. C-O grubunun varlığı 1034 cm⁻¹'de gözlenen difraksiyon pik ile belirlenmiştir. SEM görüntüleri ile yuvarlak yapıda ve yaklaşık 63 nm boyutuna sahip olan NP'lerin kümelenme eğiliminde olduğu görülmekte olup bu durum DLS analiz verilerimizi destekler niteliktedir. Şekil 6'da AG NP'lerin GO ile bağlandığı görülmektedir. Bitki özütünün kullanılması ile elde edilen NP'lerin morfolojik özelliklerine ortam pH'ı, sıcaklık, indirgeyici ajanın ve indirgenen metalin konsantrasyonunun önemli bir role sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Mittal ve ark., 2013).

Antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Biyolojik yöntemle sentezlenen Ag@GO NK'nin *S. aureus*'a karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Çeşitli metalik NP'lerin antimikrobiyal özellikleri, bakterilerin hücre duvarına bağlanması ile proteinlerin denatürasyona uğratması, membranda birikmesi ile meydana reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre ölümüne sebep olması ile açıklanabilmektedir (Kaur ve ark., 2013; Some ve ark., 201; Wang ve ark., 2017).

Bu çalışmada *S. aromaticum* özütü ile Ag@GO NK'lerin biyolojik sentezi, ucuz, etkili ve çevre dostu yöntemle sentezlenmiştir. Ag@GO NK'nin *S. aureus* suşuna karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile bitki özütü ile sentezlenen Ag tabanlı NP'lerin kitosan ve grafen oksit gibi biyomoleküller ile modifiye edilerek oksidasyon kapasitesi ve çözünürlüğünün artırılacağı, ayrıca kümelenmesinin önlenilebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abbasi BA, Iqbal J, Mahmood T, vd. Biofabrication of iron oxide nanoparticles by leaf extract of *Rhamnus virgata*: Characterization and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant potentials. Appl Organometal Chem 2019; 33: 1-15.
- Ajitha B, Reddy YAK, Lee Y, Kim MJ, Ahn CW. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Syzygium aromaticum* (clove) extract: Catalytic and antimicrobial effects. Appl Organometal Chem 2019; 33: e4867.
- Anandan M, Poorani G, Boomi P. Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles from the aqueous leaf extract of *Dodonaea viscosa* with their antibacterial and anticancer activities. Process Biochem 2019; 80: 80-8.
- Armendariz V, Herrera I, Peralta-Videa JR, Jose-Yacamán M, vd. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. J Nanopart Res 2004; 6: 377-82.
- Bansal H, Kaushal J, Chahar V, Shukla G, Bhatnagar A. green synthesis of silver nanoparticles using *Syzygium aromaticum* (clove) bud extract: Reaction optimization, characterization and antimicrobial activity. J. Bionanosci 2018; 12: 378-89.
- Behravan M, Panahi AH, Naghizadeh A, vd. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. Int J Biol Macromol 2019; 124: 148-54.
- El-Nour KMMA, Eftaiha A, Al-Warthan A, vd. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab J Chem 2010; 3: 135-40.
- Ghaedi M, Yousefinejad M, Safarpour M, Zare Khafri H, Purkait MK. *Rosmarinus officinalis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. J Ind Eng Chem 2015; 31: 167-72.
- Harshiny M, Iswarya CN, Matheswaran M. Biogenic synthesis of iron nanoparticles using *Amaranthus dubius* leaf extract as a reducing agent. Powder Technol 2015; 286: 744-9.
- Hsu KC, Chen DH. Microwave-assisted green synthesis of Ag/reduced graphene oxide nanocomposite as a surface-enhanced Raman scattering substrate with high uniformity. Nanoscale Res Lett 2014; 9: 1-9.
- Kaur H, Kaur S, Singh M. Biosynthesis of silver nanoparticles by natural precursor from clove and their antimicrobial activity. Biologia 2013; 68(6): 1048-

- 53.
- Kumar B, Vizuete KS, Sharma V, vd. Ecofriendly synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Andean Mortiño* berry as reductant and its photocatalytic activity. *Vacuum* 2019; 160: 272-8.
- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* 2013; 31: 346-56.
- Ocsoy I, Tasdemir D, Mazicioglu S, vd. Biomolecules incorporated metallic nanoparticles synthesis and their biomedical applications. *Mater Lett* 2018; 212: 45-50.
- Rajesh KM, Ajitha B, Ashok Kumar Reddy Y, Suneetha Y, Sreedhara Reddy P. Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. *Optik* 2018; 154: 593-600.
- Sahu D, Sarkar N, Sahoo G, Mohapatra P, Swain SK. Dual activities of nano silver embedded reduced graphene oxide using clove leaf extracts: Hg²⁺ sensing and catalytic degradation. *Chem Sel* 2019; 4: 2593-602.
- Sangeetha G, Sivaraj R, Rajendran V. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Aloe barbadensis* miller leaf extract: Structure and optical properties. *Mater Res Bull* 2011; 46 (12): 2560-66.
- Sankar R, Manikandan P, Malarvizhi V, vd. Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. *Spectrochim Acta A* 2014; 121: 746-50.
- Shi H, Chen X, Lia L, vd. One-pot and one-step synthesis of bioactive urease/ZnFe₂O₄ nanocomposites and their application in detection of urea. *Dalton Trans* 2014; 43: 9016-21.
- Sintubin L, Verstraete W, Boon N. Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives. *Biotechnol Bioeng*, 2012; 109(10): 2422-36.
- Some S, Bulut O, Biswas K, vd. Effect of feed supplementation with biosynthesized silver nanoparticles using leaf extract of *Morus indica* L. V1 on *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Sci Rep* 2019; 9: 14839.
- Some S, Kumar Sen I, Mandal A, vd. Biosynthesis of silver nanoparticles and their versatile antimicrobial properties. *Mater Res Express* 2019; 6: 012001.
- Strayer AL, Ocsoy I, Tan W, vd. Low concentrations of a silver-based nanocomposite to manage bacterial spot of tomato in the greenhouse. *Plant Dis* 2016; 100:1460-65.
- Vasantharaj S, Sathiyavimal S, Senthilkumar P, vd. Biosynthesis of iron oxide nanoparticles using leaf extract of *Ruellia tuberosa*: Antimicrobial properties and their applications in photocatalytic degradation. *J Photoch Photobio B* 2019;192: 74-82.
- Venugopal K, Rather HA, Rajagopal K, vd. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *J Photoch Photobio B* 2017; 167: 282-9.
- Vijayaraghavan K, Kamala Nalini SP, Udaya Prakash N, Madhankumar D. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. *Mater Lett* 2012; 75: 33-35.
- Vinay SP, Chandrasekhar N. Facile green chemistry synthesis of Ag nanoparticles using *Areca catechu* extracts for the antimicrobial activity and photocatalytic degradation of methylene blue dye. *Materials Today: Proceedings* 2019; 9: 499-505.
- Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomed* 2017;12: 1227-49.
- Yasir M, Singh J, Tripathi MK. vd. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Common arrowhead* houseplant and its anticandidal activity. *Pharmacogn Mag* 2017; 13(4): 840-44.
- Yuvakkumar R, Suresh J, Nathanael AJ, Sundraranjan M, Hong SI. Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extract and its antibacterial applications. *Mater Sci Eng C* 2014; 41: 17-27.



İneklerde Meme Başı Kanalının Ultrasonografik Ölçümlerinin Mastitis ile İlişkisi

Göksu SEKMEN¹, Tarık ŞAFAK¹, Öznur YILMAZ², Burak Fatih YÜKSEL¹, Ali RİŞVANLI¹ İbrahim ŞEKER³

¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

²Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Siirt- TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Elazığ- TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Burak Fatih YÜKSEL; E-mail: bfyuksel@firat.edu.tr; ORCID: 0000-0002-7256-9189

Atıf yapmak için: Sekmen G, Şafak T, Yılmaz Ö, Yüksel BF, Rişvanlı A, Şeker İ, İneklerde meme başı kanalının ultrasonografik ölçümlerinin mastitis ile ilişkisi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(2):131-137.

Özet: Bu çalışmanın amacı ineklerde meme başı kanalının ultrasonografik (USG) ölçümlerinin mastitis ile ilişkisini araştırmaktır. Bu amaçla, üç ve beş yaş aralığında, laktasyonun iki ile altıncı ayları arasında olan 15 baş ineğe ait elli meme başında, meme başı kanalının uzunluğu ve çapı USG olarak ölçüldü. İneklere ait meme başları California Mastitis Test (CMT) sonuçlarına göre pozitif ve negatif olarak iki gruba ayrıldı. Daha sonra meme başlarından alınan süt numunelerinde somatik hücre sayısı (SHS) belirlendi ve süt kompozisyonuna ait analizler yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiki analizleri sonucunda, CMT negatif ve CMT pozitif hayvanlarda meme başı kanalının uzunluğu ve çapı karşılaştırıldı. Gruplar arasında her iki parametre için de istatistiki olarak önemli bir fark bulunamadı. Ayrıca, CMT pozitif grupta meme başı kanalının uzunluğu ile çapı arasında pozitif korelasyon (0.60) olduğu, meme başı kanalının uzunluğu ile sütün dansitesi ve mineral düzeyi arasında ise negatif korelasyonlar olduğu (sırasıyla -0.46 ve -0.45) tespit edildi. Yine, meme başı kanalının çapı ile SHS arasında negatif korelasyon olduğu (-0.48) belirlendi. CMT negatif ve CMT pozitif gruplar arasında süt komponentleri ve bazı kimyasal özelliklerin karşılaştırılmasında ise yağ (%) ve mineral (%) değerleri hariç diğer özellikler için istatistiki olarak önemli farklılıklar bulundu. Sonuç olarak; ineklerde meme başı kanalının uzunluğu ve çapı ile mastitis arasında önemli düzeyde bir ilişkinin bulunmadığı, ancak sütün kompozisyonu ve bazı kimyasal özelliklerine ait parametreler bakımından ise ilişkili olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, meme başı kanalı, meme sağlığı, ultrasonografi

The Relationship Between Ultrasonographic Measurements of Teat Canal and Mastitis in Cows

Summary: The aim of this study was to investigate the relationship between ultrasonographic (USG) measurements of teat canal and mastitis in cows. For this purpose, the length and diameter of teat canal were USG measured at fifty teats belonging to fifteen cows aged three and five, between two and sixth months of lactation. According to the results of California Mastitis Test (CMT), the teats were divided into two groups as positive and negative. Somatic cell count (SCC) was determined in milk samples taken from teat. Consequently, statistical analysis of all data obtained, length and diameter of teat canal were compared in CMT negative and CMT positive animals. There was no statistically significant difference between the groups for both parameters. Additively, there was a positive correlation (0.60) between the length and diameter of teat canal in the CMT positive group, and there were negative correlations between the teat canal length, milk density and mineral level (respectively, -0.46, and -0.45). Again, there was a negative correlation between the diameter of the teat canal and SCC (-0.48). In the comparison of milk components and some chemical properties between the CMT negative and CMT positive groups, statistically significant differences were found for other properties except fat (%) and mineral (%) values. In conclusion; It was concluded that there was no significant correlation between the length, diameter of teat canal and mastitis in cows, but it could be related with the parameters of milk composition and some chemical properties.

Keywords: Cow, teat canal, udder health, ultrasonography

Giriş

İneklerde mastitisin gelişimine predispozisyon oluşturan çok sayıda faktör vardır. Bunlardan birisi de meme ve meme başının morfolojik özellikleridir. Memenin normal anatomik yapısı, mekanik savunma sisteminin bir parçası olarak mastitis etkenlerinin meme içine girişine engel olur. Ancak normalden büyük, sarkık, gevşek, yere yakın meme tipleri, meme başı kanalının darlığı veya aşırı genişliği memeyi mastiti-

se karşı hassas hale getirmektedir (Philpot ve Nickerson, 1991). Bu kapsamda mastitisin görülme oranının ineklerin bazı meme ölçüleri ile yakından ilişkili olduğu da bildirilmiştir (van Drop ve ark., 1998).

Hayvanların meme muayenelerinde rutin yöntemlerin yanı sıra ultrasonografi (USG) gibi görüntüleme yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu şekilde memenin iç dokusunda mastitislere sebep olabilecek anormalliklerin belirlenmesi ve erken dönemde önlemlerin alınması mümkün olabilmektedir (Ayadi ve ark., 2003; Franz ve ark., 2001; Klein ve ark., 2005; Trostle ve

O'Brien 1998). Ayrıca, memenin anatomik özellikleri hem süt verimi hem de makine ile sağılabilirliklerinin belirlenmesi açısından da önemlidir (Ayadi ve ark., 2003). Yine, sağım sonrası meme dokularının sağım öncesi şekillerine dönme sürecinin izlenmesinde de USG kullanılmaktadır (Gleeson ve ark., 2004; Khol ve ark., 2006; Paulrud ve ark., 2005; Strapák ve ark., 2017; Martin ve ark., 2018).

Meme içi yapıların değerlendirilmesinde radyoloji, endoskopi ve cutimetre gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak tüm bu yöntemlerin uygulama zorluğu, zaman alması ve meme dokularına zarar verebilme gibi bazı olumsuzlukları bulunmaktadır (Vural ve ark., 2016). Oysa, meme içi yapıların morfolojisinin değerlendirilmesinde, USG'nin kolay bir şekilde uygulanması ve non-invasiv bir yöntem olması gibi nedenlerle bu tür ölçümler için kullanımı daha fazla tavsiye edilmektedir (Gleeson ve ark., 2005; Mosenfechtel ve ark., 2004; Neijenhuis ve ark., 2001). USG yöntemi ile meme ölçülerinin belirlenmesinin, yeni enfeksiyonların gelişmesine sebep olacak meme içi faktörlerin tespiti açısından da önemlidir ve bu özelliklerin mastitis koruma-kontrol programlarında dikkate alınması gerekmektedir (Mijic ve ark., 2004; Tancin ve ark., 2003). Bu konuda Şeker ve ark., (2009) meme sağlığı ile ilgili olarak, meme başının USG'sinde, Fürstenberg rozetinin bulunduğu noktadaki meme başının çapı, sinus papillarisin çapı, meme başının çapı, meme başı kanalının uzunluğu ve meme başı duvarının kalınlığı gibi parametreleri incelemişlerdir. Sonuç olarak, meme başı kanalının uzunluğunun CMT pozitif ve negatif meme lobları arasında istatistiki düzeyde önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu açıdan USG yöntemi ile meme ölçülerinin takibinin sahada kullanımının yaygınlaştırılabilmesi ve etkinliğinin ortaya konulabilmesi için yeni yayınlara ihtiyaç olduğu da aşikardır.

Sunulan çalışmada, ineklerde meme başı kanalının USG ölçümlerinin mastitis, süt kompozisyonu ve sü-tün bazı kimyasal özellikleri ile ilişkilerini araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, 2019 yılı Ekim ayı içerisinde Fırat Üniversitesi Tarım ve Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAHAM) 'inde bulunan, yaşları 3-5 arasında değişen İsviçre esmeri ırkı 15 baş sağmal inek üzerinde gerçekleştirilmiştir. İşletmede elektronik sürü kontrol sistemi kullanılmaktadır (DeLaval, Turkey). İnekler yıl boyu yarı açık ve serbest dolaşimli ahırlarda barındırılmaktadır. Rasyonda arpa içerikli kesif yem ve kuru çayır otu, mısır silajı, yonca ve samandan oluşan kaba yemler verilmiştir. İşletmedeki ineklerin sağımı günde 2 defa 12'li otomatik sağım makinesi bulunan sağımhanede yapılmıştır (DeLaval, Turkey). İşletmede sağım hijyeni kapsamında postdipping uygulanmakta olup, çalışmada kullanılan inekle-

rin ortalama laktasyon süt verimleri 5.500±500 litre olarak kaydedilmiştir. Gruplardaki toplam meme lobu sayısını belirlemek için istatistiksel güç analizi yapılmıştır. Bu çalışmada, etki büyüklüğü =0,40, alfa=0,05 ve güç=0,80 alınarak gerekli olan minimum örnek sayısı 52 olarak belirlenmiştir. (Cohen, 1988).

Çalışmada değerlendirilen ineklerin memeleri iki grup içerisinde değerlendirilmiştir;

1. grup: CMT negatif (n=25),

2. grup: CMT pozitif (n=25).

Şeker ve ark., 2009, belirttiği şekilde grupların CMT pozitiflik ve negatiflik durumları belirlenmiştir.

Daha sonra bu gruplarda incelenen meme başlarının USG ölçümleri ve bu meme başlarından alınan süt numunelerindeki SHS, süt komponentleri (yağ (%), yağsız kuru madde (%), protein (%), laktoz (%), mineral (%)) ve bazı kimyasal parametrelerin (dansite, donma noktası (°C) ve iletkenlik (mS/cm)) analizleri yapılmıştır.

Meme başlarının ultrasonografik muayenesi

USG muayeneleri 8 Mhz'lik lineer proba (IBEX, A.B.D.) sağım sonrasında meme başları su banyosu tekniği ile ılık su dolu kaba daldırılarak yapılmıştır (Şeker ve ark., 2009). Meme başı ile ilgili ölçümlerde prob, vertikal olarak meme başı kanalına paralel bir şekilde uygulanmıştır. Bu ölçümler sırasında meme başı kanalının boyu ve eni ölçülmüştür (Şekil 1).

SHS analizi

Somatik hücre sayımı için 5 ml'lik plastik tüplere sabah sağımından sonra numune alındı. Somatik hücre sayımları DeLaval Cell Counter® (DeLaval International, Sweden) hücre sayım cihazı kullanılarak tespit edilmiştir (Saat ve ark., 2017).

California Mastitis Test

Hayvanlardan alınan süt numunelerinin CMT (Kruuse, England) ile muayenesi için CMT kabının dört ayrı bölmesine her bir meme lobundan 2 ml süt sağıldı, test kabı 45°'lik pozisyona getirilerek süt miktarları eşitlenmiştir. Süt miktarı kadar CMT çözümü eklenerek 10 saniye boyunca dairesel hareket ile karıştırılarak karışımda jel oluşumu ve jelin yoğunluğu değerlendirilmiştir (Şeker ve ark., 2009). Buna göre en az bir meme lobu hangi kategoride olursa olsun CMT'ye pozitif sonuç veren hayvanlar CMT pozitif (n=25) grubuna, tüm meme lobları CMT'ye negatif sonuç veren hayvanlar ise CMT negatif (n=25) grubuna dahil edilmiştir.

Süt kompozisyonu analizleri

Tüm süt numunelerinde, süt komponentlerinden yağ

(%), yağsız kuru madde (%), protein (%), laktoz (%), mineral (%), dansite, donma noktası (°C) ve iletkenlik (mS/cm) düzeyleri tespit edilmiştir. Bu analizler LaktoScan (Milkotronic/EUROPE) cihazı kullanılarak önceki çalışmalarda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Şeker ve ark., 2017).

SPSS 22.0 programından yararlanılmıştır.

Bulgular

Bu araştırma ele alınan CMT negatif ve CMT pozitif gruplardaki ineklerin meme başı özellikleri ile ilgili veriler Tablo 1'de özetlenmiştir. Buna göre gruplar

Tablo 1. Çalışma gruplarına ait meme başı kanalının USG ölçümlerinin karşılaştırılması

Gruplar	n	Meme başı özellikleri		
		SHS	D.P. Uzunluğu (mm)	D.P. Çapı (mm)
		$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
CMT -	25	36680.00 ± 6232.64	11.02 ± 0.41	2.18 ± 0.03
CMT +	25	370080.00 ± 53790.45	11.94 ± 0.41	2.20 ± 0.05
P		0.001	0.094	0.444

D.P. : Meme başı kanalı, SHS: Somatik Hücre Sayısı

İstatistik analizleri

Araştırma sonunda elde edilen tüm parametrelere ait verilerin tanımlayıcı istatistikleri hesaplanmıştır. Gruplar bazında (grup 1: CMT negatif ve grup 2: CMT pozitif) incelenen parametrelere ait verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Bu kapsamda Shapiro-Wilks testi kullanılmıştır. Ayrıca, verilerin normallikleri her bir parametre aritmetik ortalama, ortanca, tepe değeri, çarpıklık ve basıklık katsayıları, histogram, gövde-yaprak (stem-and-leaf) grafiği, uç ya da aykırı değerlerin gözlemlendiği saplı kutu grafiği (box plot, box-and-whiskers), P-P (Probability - Probability) grafiği, normal Q-Q (Quantile - Quantile) grafiği veya detrended normal Q-Q grafiği gibi grafiklerle de değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda verilerin parametrik test varsayımlarını sağlamadığı, normal dağılım göstermedikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, araştırmada incelenen tüm parametreler için gruplar arası karşılaştırmalarda Mann Withney U testi kullanılmıştır. Ayrıca, CMT negatif ve CMT pozitif gruplarda ayrı ayrı incelenen parametreler arasındaki ilişkileri belirlemek için spearman korelasyon katsayıları ve önemlilikleri hesaplandı (Akgül, 2005). Bu analizler için

arasında meme başı kanalının uzunluğu ve çapı açısından istatistiki bir farklılık bulunmamıştır. Ancak, SHS açısından ise gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık belirlenmiş olup, CMT pozitif ineklerin süt numunelerindeki SHS (370080.00 ± 53790.45) CMT negatif (36680.00 ± 6232.64) ineklere göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 1, Şekil 2 ve 3).

Araştırmada CMT negatif ve CMT pozitif gruplardaki ineklere ait sütlerin komponentleri ve bazı kimyasal özellikleriyle ilgili bulgular tablo 2'de özetlenmiştir. Buna göre CMT negatif ve CMT pozitif gruplardaki inekler karşılaştırıldıklarında CMT negatif grubundaki ineklerin süt numunelerinde; yağsız kuru madde (% 10.48 ± 0.10), protein (%3.80 ± 0.04), laktoz (%5.75 ± 0.05), dansite (1035.32 ± 0.53) ve donma noktası (-0.69 ± 0.01 °C) değerlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CMT pozitif gruptaki ineklere ait süt numunelerindeki iletkenlik değerinin ise (4.30 ± 0.04 mS/cm) CMT negatif gruptaki ineklerin süt numunelerine göre istatistiki olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Bu araştırmada CMT negatif gruptaki ineklerde incelenen parametreler arasındaki korelasyon katsayıları

Tablo 2. Çalışma gruplarına ait süt komponentleri ve bazı kimyasal özelliklerin karşılaştırılması

Süt komponentleri ve bazı kimyasal özellikleri	n	Gruplar		P
		CMT -	CMT +	
		$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	
Yağ (%)	25	4.38 ± 0.25	4.83 ± 0.35	0.607
Yağsız Kuru Madde (%)	25	10.48 ± 0.10	10.10 ± 0.11	0.011
Protein (%)	25	3.80 ± 0.04	3.68 ± 0.04	0.022
Laktoz (%)	25	5.75 ± 0.05	5.53 ± 0.06	0.009
Mineral (%)	25	0.82 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.073
Dansite	25	1035.32 ± 0.53	1033.44 ± 0.47	0.002
Donma noktası (°C)	25	-0.69 ± 0.01	-0.67 ± 0.01	0.046
İletkenlik (mS/cm)	25	4.15 ± 0.02	4.30 ± 0.04	0.000

Tablo 3. CMT negatif grupta incelenen parametreler arasındaki korelasyon katsayıları (r) ve önemlilikleri (P) (n=25)

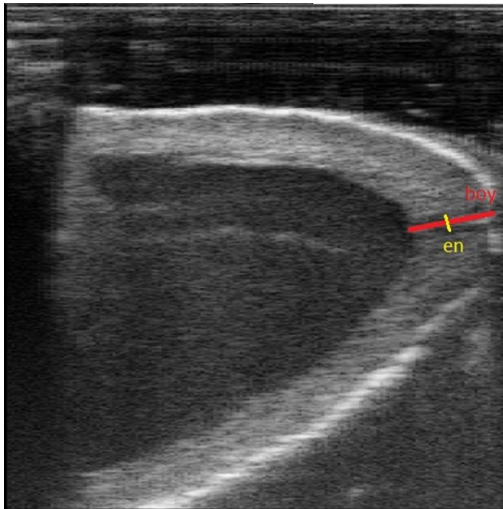
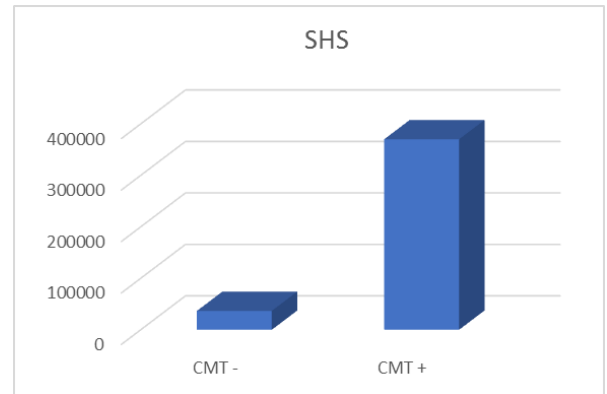
		D.P. Uzunluğu (mm)	D.P. Çapı (mm)	SHS (x1000)	Yağ (%)	Yağsız Kuru Madde (%)	Dansite	Protein (%)	Laktöz (%)	Mineral (%)	Donma noktası (°C)	İletkenlik (mS/cm)
D.P. Uzunluğu (mm)	r	1	0.65**	0.49*	0.19	-0.32	-0.32	-0.33	-0.27	-0.38	0.30	0.10
	P		0.00	0.01	0.35	0.12	0.12	0.11	0.19	0.06	0.14	0.62
D.P. Çapı (mm)	r		1	0.37	0.12	-0.17	-0.15	-0.16	-0.20	-0.23	0.17	-0.04
	P			0.07	0.57	0.41	0.47	0.44	0.34	0.26	0.41	0.85
SHS (x1000)	r			1	0.28	-0.50*	-0.43*	-0.47*	0.52**	-0.28	0.51**	0.32
	P				0.17	0.011	0.031	0.02	0.01	0.18	0.01	0.12

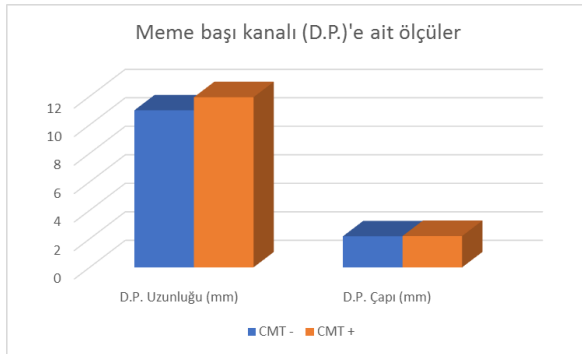
** : Korelasyon P<0.01 düzeyinde önemlidir. * : Korelasyon P<0.05 düzeyinde önemlidir. **D.P.**: Meme başı kanalı, **SHS**: Somatik Hücre Sayısı

Tablo 4. CMT pozitif grupta incelenen parametreler arasındaki korelasyon katsayıları (r) ve önemlilikleri (p) (n=25)

		D.P. Uzunluğu (mm)	D.P. Çapı (mm)	SHS (x1000)	Yağ (%)	Yağsız Kuru Madde (%)	Dansite	Protein (%)	Laktöz (%)	Mineral (%)	Donma noktası (°C)	İletkenlik (mS/cm)
D.P. Uzunluğu (mm)	r	1	0.60*	-0.25	0.34	-0.36	-0.46*	-0.35	-0.39	-0.45*	0.23	-0.07
	P		0.01	0.23	0.10	0.07	0.02	0.08	0.06	0.03	0.26	0.74
D.P. Çapı (mm)	r		1	-0.48*	0.25	-0.01	-0.18	-0.02	-0.06	-0.01	-0.07	-0.25
	P			0.01	0.22	0.96	0.39	0.92	0.79	0.99	0.75	0.23
SHS (x1000)	r			1	-0.31	0.15	0.32	0.12	0.11	-0.12	-0.03	0.45*
	P				0.13	0.48	0.12	0.56	0.59	0.57	0.91	0.03

** : Korelasyon P<0.01 düzeyinde önemlidir. * : Korelasyon P<0.05 düzeyinde önemlidir. **D.P.**: Meme başı kanalı, **SHS**: Somatik Hücre Sayısı

**Şekil 1.** Meme başı kanalının USG ölçümleri**Şekil 2.** CMT negatif ve CMT pozitif gruplar arasında SHS'nin karşılaştırılması. **SHS**: Somatik hücre sayısı



Şekil 3. CMT negatif ve CMT pozitif gruplar arasında meme başı kanalı ölçülerinin karşılaştırılması **D.P.:** Meme başı kanalı

(r) ve önemlilikleri (p) Tablo 3'te verilmiştir. Buna göre meme başı kanalının uzunluğu ile çapı (0.65) ve meme başı kanalının uzunluğu ile SHS arasında pozitif korelasyon (0.49) tespit edilmiştir. Ayrıca SHS ile yağsız kuru madde (-0.50), dansite (-0.43), protein (-0.47) ve laktoz (-0.52) arasında negatif korelasyonlar belirlenmiştir. Yine SHS ile donma noktası (-0.51) arasında ise pozitif korelasyon belirlenmiştir (Tablo 3).

CMT pozitif gruptaki ineklerde incelenen parametreler arasındaki korelasyon katsayıları (r) ve önemlilikleri (P) ise Tablo 4'te verilmiştir. Buna göre meme başı kanalının uzunluğu ile çapı arasında (0.60) pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Meme başı kanalının uzunluğu ile dansite (-0.46) ve mineral düzeyi (-0.45) arasında ise negatif korelasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca meme başı kanalının çapı ile SHS arasında negatif korelasyon (-0.48) tespit edilmiştir. Yine SHS ile iletkenlik arasında ise pozitif bir korelasyon (0.45) saptanmıştır (Tablo 4).

Tartışma ve Sonuç

Meme içi yapıların morfolojisinin muayene tarihindeki süt verimi, laktasyon sayısı, laktasyon dönemi ve meme lobuna göre değiştiği ayrıca, bu değişikliklerin incelenmesi için USG'nin etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Khol ve ark., 2006). Santos ve ark. (2004) meme başı anatomisinin USG ile belirlenmesinde meme başlarının su banyosuna daldırılarak muayenesinin diğer yöntemlere göre daha iyi görüntü verdiğini bildirmektedir. Yapılan bir çalışmada, meme başı morfolojisinin sağım öncesi ve sonrasında değişiklikler gösterdiği ve yaşlı ineklerin USG ile yapılan meme başı ölçüm değerlerinin genç ineklere göre daha yüksek çıktığı, aynı zamanda sütteki bakteri yoğunluğuna göre parametrelerde farklılıklar olduğu bildirilmektedir (Martin ve ark., 2018). Strapák ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, Holştayn ırkı ineklerde sağım öncesi ve sağım sonrası meme başı kanalının USG ölçümlerinin değiştiği tespit edilmiştir. Strapák ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada Holştayn ve Si-

mental ırkı ineklerde sağım sonrası farklı sürelerde USG ile meme başına ait ölçümleri değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirmede, iki ırk içinde rejenerasyon süresinin birbirine yakın olduğu ve bununla birlikte günlük süt verimi, süt akış hızı gibi faktörlerin değerleri etkilediğini bildirmişlerdir. Tóth ve ark. (2019) kuru dönemde meme başını USG ile incelemiş ve kuru dönemin başlangıcında değerlerin azaldığını, kuru dönem ortasına kadar bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir. Bu dönemde meme involüsyonunun ve rejenerasyonunun sağlıklı ilerlemesi ile mastitis riskinin azaldığını belirtirken bu sürecin iyi ilerlememesi durumunda mastitis olasılığının artacağını belirtmişlerdir. 12 saat aralıklarla yapılan sağımlarda sağım öncesi meme başı kanalının uzunluğunun ön memelerde 13.0 mm ve arka memelerde ise 12.1 mm olduğu bildirilmektedir (Neijenhuis ve ark., 2004). Weiss ve ark. (2004) meme lobuna göre meme başı kanalının uzunluğunun USG ölçümlerinin farklı olmadığını, sol ve sağ ön-arka meme başlarında meme başı kanalının uzunluğunu 11 mm olduğunu ileri sürmektedir. Klein ve ark., (2005) USG ile meme başı kanalının uzunluğunu en kısa olarak İsviçre Esmerlerinde (15.7 mm) daha sonra Holstein-Friesian'larda (17.2 mm) ve Simmental'lerde (18.3 mm) tespit etmiştir. Aynı çalışmada, meme başı kanalının uzunluğu ile meme sağlığının ilişkili olduğu, bu uzunluğun sağlıklı memelerde (17.4 mm) enfekte memelere (15.8 mm) nazaran daha uzun olduğu bildirilmiş olup, meme sağlığı üzerine meme başı kanalının uzunluğu ve laktasyon sayısının önemli etkileri olduğu kaydedilmiştir. Grindal ve ark. (1991) meme başı kanalının uzunluğunu enfekte meme başlarında 11.47 mm ve enfekte olmayanlarda ise 12.05 mm olarak kaydetmişlerdir. Gulyas ve Ivancsics (2001) ise meme başı kanalının uzunluğu ile SHS arasında yakın bir korelasyon tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada ise CMT negatif ve CMT pozitif hayvanlarda meme başı kanalının uzunluğu ve çapı açısından istatistiki olarak önemli düzeyde bir fark bulunmamıştır. Bu durumun, mastitisin multifaktöriyel bir hastalık olması ve gelişiminde çok sayıda predispoze faktör olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında, ineklerde meme başı kanalının USG ile yapılan ölçümleri ile sütün kompozisyonu arasındaki ilişkiyi konu alan herhangi bir bilimsel içerikli çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak meme başının morfolojik ölçümleri ile sütün kompozisyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan bir çalışmada (Wagay ve ark., 2018) meme başının morfolojik ölçümleri ile süt yağı arasında pozitif, laktoz ve protein arasında ise negatif korelasyon olduğu ileri sürülmektedir. Sunulan çalışmada ise özellikle CMT pozitif grupta meme başı kanalının uzunluğu ile sütün dansitesi ve mineral düzeyi arasında önemli negatif korelasyonlar belirlendi.

Sonuç olarak, ineklerin meme başı kanalının uzunluğu ve çapına ait USG özellikleri ile mastitis arasında

istatistiki olarak önemli bir ilişkiye rastlanmamış, ancak bu özelliklerin sütün dansitesi, mineral düzeyi gibi süt komponentleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Akgül A. Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri- SPSS Uygulamaları 3. Baskı. Ankara: Emek Ofset Ltd. Şti. 2005; s. 95-382.
- Ayadi M, Caja G, Such X, Knight CH. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J Dairy Res* 2003; 70 (1): 1-7.
- Cohen J. *The Analysis of Variance and Covariance. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Second Edition.* Lawrence Erlbaum Associates, 1988; p. 273-406.
- Franz S, Hofmann-Parisot M, Baumgartner W, Windischbauer G, Suchy A, Bauder B. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheep. *Vet Rec* 2001; 149 (4): 109-112.
- Gleeson DE, O'Callaghan EJ, Rath MV. Effect of liner design, pulsator setting, and vacuum level on bovine teat tissue changes and milking characteristics as measured by ultrasonography. *Irish Vet J* 2004; 57 (5): 289-296.
- Gleeson DE, O'Callaghan EJ, Meaney WJ, Rath MV. Effect of two milking systems on the milking characteristics, teat tissue changes and new infection rate of dairy cows. *Anim Res* 2005; 54 (4): 259-267.
- Grindal RJ, Walton AW, Hillerton JE. Influence of milk flow rate and streak canal length on new intramammary infection in dairy cows. *J Dairy Res* 1991; 58 (4): 383-388.
- Gulyas L, Ivancsics J. Relationship between the somatic cell count and certain udder-morphologic traits. *Arch Anim Breed* 2001; 44 (1): 15-22.
- Khol JL, Franz S, Klein D, Lexer D, Waiblinger S, Luger K, Baumgartner W. Influence of milking technique and lactation on the bovine teat by means of ultrasonographic examination. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119 (1-2): 68-73.
- Klein D, Flock M, Khol JL, Franz S, Stuger HP, Baumgartner W. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J Dairy Res* 2005; 72 (3): 296-302.
- Martin LM, Stöcker C, Sauerwein H, Büscher W, Müller U. Evaluation of inner teat morphology by using high-resolution ultrasound: Changes due to milking and establishment of measurement traits of the distal teat canal. *J Dairy Sci* 2018; 101 (9): 8417-8428.
- Mijic P, Knezevic I, Domacinovic M. Connection of milk flow curve to the somatic cell count in bovine milk. *Arch Anim Breed* 2004; 47 (6): 551-556.
- Mosenfechtel S, Dummer N, Hoedemaker M. Comparison of clinical, sonographic and endoscopic examination of teats from healthy and diseased bovine mammary glands. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2004; 32 (4): 196-204.
- Neijenhuis F, Hillerton JE, Bos K, Sampimon O, Poelarends J, Fossing C, Dearing J. Effects of milking interval on teat condition and milking performance with whole-udder take off. Automatic milking-a better understanding. Wageningen, Nederland. Wageningen Academic Publishers 2004; 177-178.
- Neijenhuis F, Klungel GH, Hogeveen N. Recovery of teats after milking as determined by ultrasonographic scanning. *J Dairy Sci* 2001; 84 (12): 2599-2606.
- Paulrud CO, Clausen S, Andersen PE, Rasmussen MD. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet Scand* 2005; 46 (3): 137-147.
- Philpot WN, Nickerson SC. *Mastitis: Counter Attack.* Illinois: Babson Bros Co, 1991; p.73.
- Saat N, Risvanli A, Seker I, Kaygusuzoglu E, Koseman A. Optimization of the estrus synchronization method and its effect on bulk tank milk somatic cell count in dairy cattle farming. *Int J Agric Biol* 2017; 19 (4): 801-804.
- Santos DAS, Vicente WRR, Canola JC, Léga E. B-mode ultrasonography in cows during lactation to evaluate the teat anatomy using four different techniques. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2004; 41 (5): 350-354.
- Seker I, Risvanli A, Calicioglu M, Incili GK, Saat N. Effects of different estrous synchronization methods on the composition of Simmental cow's milk. *Acta Sci Vet* 2017; 45, 1-7.
- Seker I, Risvanli A, Yuksel M, Saat N, Ozmen O. Relationship between California Mastitis Test score and ultrasonographic teat measurements in dairy cows. *Aust Vet J* 2009; 87 (12): 480-483.
- SPSS 22.0 Statistical Package in Social Sciences for Windows. 2015; Chicago, USA.
- Strápák P, Strápáková E, Rušinová M, Szenczióvá I. The influence of milking on the teat canal of dairy cows determined by ultrasonographic measurements. *Czech J Anim Sci* 2017; 62 (2): 75-81.

- Strapák P, Szencziová I, Strapáková E. Measurement of teat structures of dairy cows through ultrasonography and examination of morphological changes in teats caused by machine milking. *Veterinarija ir Zootechnika* 2018; 76 (98): 62-69.
- Tancin V, Ipema AH, Peskovicova D, Hogewerf PH, Macuhova J. Quarter milk flow patterns in dairy cows: Factors involved and repeatability. *Vet Med* 2003; 48 (10): 275-282.
- Tóth T, Abonyi-Tóth Z, Pajor F, Kocsis R, Juhász A, Tózsér J, Póti P. Changes in the values of two ultrasound-examined teat parameters during the dry period in dairy cows. *Acta Vet Hung* 2019; 67 (3): 456-462.
- Trostle SS, O'Brien RT. Ultrasonography of the bovine mammary gland. *Compend Contin Educ Vet* 1998; 20 (2): 64-71.
- Van Drop TE, Dekkers JCM, Martin SW, Noordhuizen JPTM. Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows. *J Dairy Sci* 1998; 81 (8): 2264-2270.
- Vural MR, Ergün Y, Özenç E. Büyük ruminantlarda mastitis. Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Eds. In: *Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları*. 1. Baskı. Malatya: Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., 2016; s. 149-247.
- Wagay MA, Tomar AKS, Lone SA, Singh AK, Carolina P. Association of milk quality parameters with teat and udder traits in Tharparkar cows. *Indian J Anim Res* 2018; 52 (9): 1368-1372.
- Weiss D, Weinfurtnner M, Bruckmaier RM. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87 (10): 3280-3289.



Fluoxetine and *Gundelia tournefortii* L. Plant Extract in Rats Exposed to Chronic Immobilization Stress; Determination of Effect on Anxiety, Motor Activity, Kidney and Liver Tissues*

Hamdullah YUKSEL¹, Bedia BATI¹, Gokhan OTO², Omer BINGOL¹

¹Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Education, Department of Mathematics and Science Education, Van-TURKEY

²Van Yuzuncu Yil University, School of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Van-TURKEY

Corresponding author: Bedia BATI; E-mail: bediabati@yyu.edu.tr; ORCID ID: 0000-0001-9501-7822

How to cite: Yüksel H, Batı B, Oto G, Bingöl O. Fluoxetine and *Gundelia tournefortii* L. plant extract in rats exposed to chronic immobilization stress; determination of effect on anxiety, motor activity, kidney and liver tissues. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(2):138-148.

Summary: This study was completed with the aim of investigating the effects of extracts obtained from *Gundelia tournefortii* L. and fluoxetine on anxiety, motor activity, biochemical and antioxidant parameters in rats exposed to chronic immobilization stress. The study included a total of 40 female Wistar albino rats with live weight of 200-220 g, randomly divided into groups of 8 rats with the study duration planned as 30 days. The groups created in the study were "control", "physiologic serum + chronic immobilization", "*Gundelia tournefortii* L. plant extract", "*Gundelia tournefortii* L. plant extract + chronic immobilization" and "fluoxetine + chronic immobilization". At the end of 30 days, all the groups had rotarod test (motor activity) and anxiety test (elevated plus maze) applied and after all the tests were completed the rats were sacrificed. At the end of the study, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), uric acid (UA), creatinine (CRE), total protein (TP) and albumin levels were determined. Additionally, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) activity and reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were identified in liver and kidney tissue samples. In conclusion, administration of both *Gundelia tournefortii* L. plant extract and fluoxetine can be said to have positive effects on enzyme activities and MDA parameter value against experimentally-induced immobilization stress. Additionally, *Gundelia tournefortii* L. was not identified to have any effect on motor activity, but identified to have anxiolytic effect according to elevated plus maze test results.

Key words: Chronic immobilization stress, elevated plus maze, fluoxetine, *Gundelia tournefortii* L., rotarod

Kronik Immobilizasyon Stresine Maruz Bırakılan Ratlarda Fluoksetin ve *Gundelia tournefortii* L. Bitki Ekstresinin; Anksiyete, Motor Aktivite, Böbrek ve Karaciğer Dokuları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Özet: Bu çalışma, kronik immobilizasyon stresine maruz bırakılan ratlarda anksiyete, motor aktivite, biyokimyasal ve antioksidan parametre değerleri üzerine *Gundelia tournefortii* L. bitkisinden elde edilen ekstraktın ve Fluoksetin'in etkilerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada canlı ağırlıkları 200-220 gr olan toplam 40 adet Wistar – albino ırkı dişi sıçan her grupta 8 sıçan olacak şekilde gruplara rastgele dağıtılmış ve çalışmanın süresi toplam 30 gün olarak planlanmıştır. Çalışmadaki gruplar; "Kontrol", "Serum fizyolojik su + Kronik Immobilizasyon", "*Gundelia tournefortii* L. bitki ekstresi", "*Gundelia tournefortii* L. bitki ekstresi + Kronik immobilizasyon" ve "Fluoksetin + Kronik immobilizasyon stresi" şeklinde oluşturulmuştur. 30'uncu gün sonunda tüm gruplara rotarod testi (motor aktivite testi) ve anksiyete testi (yükseltilmiş artı labirent testi) uygulanarak tüm testler tamamlandıktan sonra uygulama sonunda sıçanlar kurban edilmiştir. Çalışma sonunda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfataz (ALP), ürik asit(UA), kreatinin (CRE), total protein (TP), albumin düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca, karaciğer ve böbrek dokusu örneklerinde katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri ve redükte glutatyon (GSH) ile malondialdehit (MDA) düzeyleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, deneysel olarak oluşturulan immobilizasyon stresine karşı, hem *Gundelia tournefortii* L. bitki ekstresinin hem de Fluoksetin uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine ve MDA parametre değeri üzerine olumlu etkiler sergilediği söylenebilir. Bununla birlikte, *Gundelia tournefortii* L. bitkisinin; motor aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilirken, yükseltilmiş artı labirent testi sonuçlarına göre, anksiyolitik etkisi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Fluoksetin, *Gundelia tournefortii* L., kronik immobilizasyon stresi, rotarod, yükseltilmiş artı labirent

Introduction

Anxiety is defined as worry, or even a feeling of fear, a person feels in response to a perceived internal or

external threat caused by different situations. Different events or formations may cause anxiety (APPI). In recent years, anxiety is frequently observed around the world, causing an increase in clinical and if necessary preclinical studies related to treatment of this disease. Preclinical studies research the anxiolytic effects of new medications in animal studies. For

Geliş Tarihi/Submission Date : 10.09.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 16.06.2020

*The authors are grateful for financial support provided by the University of Van Yuzuncu Yil Grant Commission (YYU-BAP TYL-2017-6000). This study derived from the master's thesis of the first author.

these models, rats and mice are most commonly used amongst rodents (Aykaç et al., 2015). These species are intensely used for research into underlying mechanisms of emotional and motivational functions on the ground. This increased behavior of rats in situations when they are placed in areas where they feel unprotected is closely related to anxiety. As the anxiety situation increases, research behavior of rats reduces (Barnett, 2007; Aykaç et al., 2015). Some studies have led to the consideration that stress and anxiety may be the result of inflammation and oxidative stress processes (Salim et al., 2011; Yang et al., 2016).

Stress ensures the stimulation of many adaptive responses in the central and peripheral nervous system, but may lead to negative physiologic outcomes like insufficient growth metabolism, circulation, reproduction and immune responses and excessive or long-term stimulation (Barbieri et al., 2012). Long-term stress may cause a variety of discomforts like behavioral depression (Pedreanez et al., 2011), post-traumatic stress disorder (Kessler and Sonnega, 1995), and anxiety (Gulati et al., 2009). When metabolic activity increases, free radical production also increases, causing the production of reactive oxygen species (ROS) in the environment and imbalance in the antioxidant system (Lobo et al., 2010; Dias et al., 2014; Dong et al., 2016). ROS causes oxidative injury to different molecules in cells like proteins, lipids and nucleic acids (Ali et al., 2017; Turan and Celik 2016). Oxidative stress is thought to be the main factor in the development of many complications like neurodegenerative diseases, mainly, chronic kidney disease, hepatic inflammation, hepatic cirrhosis, hypercholesterolemia, diabetes, etc. (Gutteridge, 1995). As a result, morbidity rates related to a variety of diseases may increase as a result of exposure to long-term physiologic and psychological stress (Djordjevic et al., 2010).

Currently stress is a frequently encountered problem, with antidepressant medications used with the aim of treating depression caused by stress. One of the most commonly used of these antidepressant medications is fluoxetine. Fluoxetine is a prototype serotonin reuptake inhibitor. It is commonly used for treatment of panic and other anxiety disorders. Clinical observation of panic attack patients has confirmed its efficacy and reliability in reducing panic attack incidence, phobic symptoms, depressive and anxiety symptoms (Starevic et al., 2004). Additionally, fluoxetine has variable anxiety and depression effects in animal models (Borsini et al., 2002). There is a need for studies in this area to investigate the effects of this antidepressant medication.

In Turkey and the world in general, different plants are used with the aim of treating anxiety. One of these plants, with large area of use among the public,

is the plant *Gundelia tournefortii* L. known as "Kenger" in Iran. *Gundelia tournefortii* L. is an edible member of the Asteraceae family specific to Iran, Turkey, Azerbaijan, Jordan, Cyprus and other regions (Coruh et al., 2007; Matthäus and Özcan, 2011). Generally, the stem of the plant is used for medication aims in traditional medicine as hepatoprotective and blood cleaning and for diabetes, heart attacks, etc. in the Middle East (Hamdan and Afifi, 2004; Jamshidzadeh et al., 2005; Halabi et al., 2005). *Gundelia tournefortii* L. has high phenolic content, with caffeoylquinic acid derivatives, quercetin, and gallic acid and is very rich in other compounds like limonene, zingiberene and saponins responsible for the biological activity of the plant (Nakatani et al., 2000; Haghi et al., 2011; Asadi-samani et al., 2013). Polyphenols in this plant are potential antioxidants and may play an important role in preventing a variety of pathologic situations (Coruh et al., 2007; Asgary et al., 2009; Haghi et al., 2011). Some studies have evaluated the antiatherosclerotic properties of *Gundelia tournefortii* L. as being the result of hypolipidemic, anticoagulant and antioxidant properties (Hammadi and Salam, 2004; Asgary et al., 2009). Some animal studies have shown *Gundelia tournefortii* L. may regulate lipid profiles. The plant has also displayed antiinflammatory, analgesic and antioxidant effects during in vitro and in vivo studies (Coruh et al., 2007; Oryan et al., 2011).

The aim of this study was to determine the effect of *Gundelia tournefortii* L. on anxiety in rats with chronic immobilization stress and to determine the effect of this plant on various antioxidant enzyme levels and oxidative stress markers in liver and kidney tissues.

Materials and methods

Reagents

Thiobarbituric acid, butylated hydroxytoluene, trichloroacetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, reduced glutathione, metaphosphoric acid, DTNB, Tris, CDNB, GSSG, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, potassium dihydrogen phosphate and sodium chloride of technical grade used in this study were obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Reagents for antioxidant enzyme analysis were purchased from Randox Laboratories Ltd.

Collection of plant material and preparation of *Gundelia tournefortii* L. water extract

The plant material used in this study of *Gundelia tournefortii* L. was collected from around the province of Diyarbakır in May. Plants placed in cloth bags were first washed with tap water and then with distilled water to remove dust and contamination. The plants were spread on drying paper in the laboratory environment and then air-dried. The drying paper under

the lower sections of the plants was changed each day. Plants were rotated daily to prevent humidity and mold. The *Gundelia tournefortii* L. plants were ground in an electric mill and passed through a 0.5 mm sieve. The plants were left in tightly-sealed colored glass jars until use. Hot water extraction of *Gundelia tournefortii* L. was completed with modifications of the decoction method applied by Eddouks et al. (2005). After 1 g of ground *Gundelia tournefortii* L. was boiled in 100 ml distilled water for 10 minutes, it was left in the open to cool for 15 minutes. The extract was filtered with Whatman filter paper and water was completely removed in a lyophilizer and the lyophilized extract stored at -80 °C was diluted daily and administered to rats orally in 300 mg/kg dose (Azeez and Kheder, 2012).

Experimental animals

The study used 40 female Wistar albino rats with live weight of 200-220 g as animal material. The study received written consent from Van Yuzuncu Yil University Experimental Animals Unit Ethics Committee dated 02.03.2017 and numbered "02". Rats were housed at room temperature (25±1 °C), with 12-hour light/12-hour dark period and fed *ad libitum*. A total of 5 groups were created in this study which lasted 30 days.

Control group: Rats with no additional intervention other than standard feed and water.

Physiologic serum + chronic immobilization group (Stress): Rats exposed to 30 minutes immobilization stress every day for 30 days, administered oral physiologic serum 30 minutes before being placed in immobilization cages.

Gundelia tournefortii L. water extract group (Gundelia): Rats administered 300 mg/kg oral *Gundelia tournefortii* L. water extract for 30 days.

Gundelia tournefortii L. water extract + chronic immobilization group (Gundelia + Stress) : Rats exposed to 30 minutes immobilization stress every day for 30 days, administered 300 mg/kg oral *Gundelia tournefortii* L. water extract 30 minutes before being placed in immobilization cages.

Fluoxetine + chronic immobilization group (Fluoxetine): Rats exposed to 30 minutes immobilization stress every day for 30 days, administered 10 mg/kg/day oral fluoxetine 30 minutes before being placed in immobilization cages.

Chronic immobilization stress (restrainer) was applied with the aim of inducing anxiety among rats in groups 2, 4 and 5 in the study. In order to perform biochemical analyses at the end of the study, rats were anesthetized with 10% ketamine and sacrificed.

Behavioral evaluations

There are many behavior test models used for evaluation of the cognitive and locomotor status of rats. These tests assess more than one status like anxiety, autonomic functions, learning, memory and locomotor activity in rats (Buyukdereli, 2008). With this aim, present study applied the elevated plus maze test and the rotarod test.

The elevated plus maze is a common technique used to evaluate anxiety. This technique is used to research the physiologic, behavioral and pharmacologic effects of medications or other materials by testing emotional activity. With different sizes prepared for mice and rats, this setup comprises a test pattern with two open arms and two closed arms in a plus shape (+) at a certain elevation (Walf and Frye, 2007).

One of the most commonly used tests to measure motor coordination is the rotarod performance scale. The rotarod test is a method used to assess performance, resistance power, balance and coordinated movements (Kaur and Ling, 2008).

Anxiety test: Rats had the elevated plus maze applied. The test has two open and two closed arms (width 12 cm, length 50 cm) and a central region where the arms meet, set up 50 cm above the floor. Each subject is left in the center of the setup looking at the open arms, and monitored for 5 minutes with a Noldus Ethno Vision Tracking camera system. After the experiments, statistical analysis is performed on the time the animal stays in the open arms of the setup and number of entries into the open arms.

Motor activity test: The rotarod test is a method used to assess performance, resistance power, balance and coordinated movements. The test basically measures the duration an experimental animal can stay on a rod rotating with fixed speed without falling. During the test, subjects have duration on the rotating rod recorded in seconds with an automatic counter (Kurt et al., 2002; Ferrante et al., 2002). In the first stage of the study, rats are taught to stay on the device rotating at 6 rpm for 3 minutes. Then each animal is given 3 60-second attempts at 16 rpm. In this way, the total score is the total from the three attempts (maximum value 180 s). The duration (s) the rats stay on the device without falling is accepted as rotarod performance.

Biochemical analysis

Preparation of tissue supernatant: At the end of the 30-day experiment, rats were anesthetized with 10% ketamine and sacrificed. Blood samples were taken from the heart with an injector for biochemical analysis. Liver and kidney tissues were washed in dilute physiologic serum (0.9% NaCl) and stored at -

78 °C until analysis. Tissues were homogenized for 5 minutes in 50 mM ice-cold KH_2PO_4 solvent (1:5 w/v) with an ultrasonic homogenator (20 KHz frequency ultrasound, Jencons Scientific Co.). Homogenate was centrifuged at 7000 g for 15 minutes at +4 °C. Liver and kidney tissue were prepared for analysis. Supernatants were used to determine antioxidant defense system and MDA content (Yurt and Celik, 2011).

Determination of antioxidant system in liver and kidney tissue: In liver and kidney tissue, SOD enzyme activity was measured in accordance with the Randox brand spectrophotometric kit protocol. CAT activity catalyzing the hydrolysis of oxygen and water in hydrogen peroxide used the Aebi (100) method (Aebi, 1974). The tissue was tested according to Randox's spectrophotometric kit protocol for GPx measurement. GR activity was tested with the Carlberg and Mannervik method (Carlberg and Mannervik, 1985). GST activity was tested with the Mannervik and Guthenberg method (Mannervik and Guthenberg, 1981). Tissue GSH activity was measured with the Beutler et al. method (Beutler et al., 1963). MDA concentration was determined using the method described by Jain et al. (Jain et al., 1989).

Measurement of biochemical parameters: AST, ALT, ALP, uric acid (UA), creatinine (CRE), total protein (TP) and albumin were measured by an auto analyzer (COBAS 8000/ROCHE/Germany/Serial No 1296-08) using the Roche kits.

Statistical analysis

Inter-group comparisons were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) and chi-square analysis (for comparison of rates in independent groups), while multiple comparisons used the Tukey test in the R 3.5.1 (R Core Team, 2018) program. Significance level was taken as $P < 0.05$.

Result

The anxiety test results obtained in this study are shown in Tables 1, 2 and 3, while motor activity test results are shown in Table 4.

According to Table 1, on the 15th day of the experiments, the *Gundelia tournefortii* L. groups and fluoxetine group had significant increases in the duration in the open area compared to the control group ($P < 0.05$). Additionally, the groups administered *Gundelia tournefortii* L. and fluoxetine group had significant increases in time spent in the open area compared to the group only exposed to immobilization stress ($P < 0.05$). On the 30th day experiments, the duration of time spent in the open area was significantly reduced for only the immobilization group compared to the control group at $P < 0.05$ level. Groups administered *Gundelia tournefortii* L. had significant increases in time spent in the open area compared to the control group, while the fluoxetine group did not show statistical significance compared to the control group in terms of time spent in the open area ($P > 0.05$). The *Gundelia tournefortii* L. groups and fluoxetine groups showed significant increases in time spent in the open area compared to the group only exposed to immobilization stress ($P < 0.05$).

According to Table 2, on the 15th day experiments, the number of entries into the open area was identified to statistically significantly reduce in the group undergoing only immobilization stress compared to the control group ($P < 0.05$). Only the number of entries into the open area of the group administered *Gundelia tournefortii* L. was not statistically significant compared to the control group ($P > 0.05$), while there was a significant increase in the *Gundelia tournefortii* L. + stress group compared to the control group at $P < 0.05$ level. The fluoxetine group had an increase in the number of entries into the open area, but was not determined to show statistical significance compared to the control group ($P > 0.05$). Compared to the group only exposed to immobilization stress model, the *Gundelia tournefortii* L., *Gundelia tournefortii* L. + stress and fluoxetine groups had significant increases in number of entries into the open area ($P < 0.05$). In experiments on the 30th day, the number of entries into the open area was reduced in the group only undergoing immobilization stress compared to the control group; however, this reduction was not determined to be statistically significant ($P > 0.05$). Com-

Table 1. Time spent by the rats in the open area (sec)

Days	Groups					P Values
	Control $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Stress $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	<i>Gundelia</i> $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	<i>Gundelia</i> + Stress $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Fluoxetine $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
15 th day	31.64 ± 1.50	17.84 ± 1.77	66.30 ± 7.65 ^{ab}	85.17 ± 6.71 ^{ab}	54.43 ± 4.49 ^{abd}	0.0008
30 th day	25.37 ± 1.32	16.89 ± 1.28 ^a	42.57 ± 2.08 ^{ab}	52.68 ± 2.61 ^{abc}	33.47 ± 0.90 ^{bcd}	0.0007

a: Statistically significant difference compared to control group ($P < 0.05$)

b: Statistically significant difference compared to the stress group ($P < 0.05$)

c: Statistically significant difference compared to the *Gundelia* group ($P < 0.05$)

d: Statistically significant difference compared to the *Gundelia* + stress group ($P < 0.05$)

\bar{X} : Mean, $S_{\bar{X}}$: Standard error

Table 2. Number of entries into the open area.

Days	Groups					P Values
	Control $\bar{X} \pm S_z$	Stress $\bar{X} \pm S_z$	<i>Gundelia</i> $\bar{X} \pm S_z$	<i>Gundelia</i> + Stress $\bar{X} \pm S_z$	Fluoxetine $\bar{X} \pm S_z$	
15 th day	6.00 ± 0.38	4.25 ± 0.31 ^a	6.13 ± 0.55 ^b	7.88 ± 0.44 ^{abc}	7.38 ± 0.38 ^b	0.0003
30 th day	1.25 ± 0.16	0.50 ± 0.19	2.88 ± 0.44 ^{ab}	3.38 ± 0.38 ^{ab}	2.38 ± 0.26 ^b	0.0007

a: Statistically significant difference compared to control group (P<0.05)
 b: Statistically significant difference compared to the stress group (P<0.05)
 c: Statistically significant difference compared to the *Gundelia* group (P<0.05)
 \bar{X} : Mean, S_z : Standard error

pared to the control group, the *Gundelia tournefortii* L. and *Gundelia tournefortii* L. + stress groups had significant increases in entries into the open area (P<0.05). The increase in entries into the open area in the fluoxetine group was not statistically significant compared to the control group (P>0.05). The *Gundelia tournefortii* L., *Gundelia tournefortii* L. + stress and fluoxetine groups had significant increases in the number of entries into the open area compared to the group only administered the immobilization stress model (P<0.05).

show statistical significance compared to the control group (P>0.05). Compared to the group only undergoing the immobilization stress model, the *Gundelia tournefortii* L., *Gundelia tournefortii* L. + stress and fluoxetine groups had significant increases in percentage entering the open area (P<0.05). In the 30th day experiments, the percentage entering the open area was reduced in the group only undergoing immobilization stress compared to the control group; however, this reduction was not determined to be statistically significant (P>0.05). Compared to the

Table 3. Total number of entrances to open area and percentage

Days		Groups					P Values
		Control	Stress	<i>Gundelia</i>	<i>Gundelia</i> + Stress	Fluoxetine	
15 th day	N	48	34	49	63	59	0.0002
	%	31	34 ^a	43 ^{ab}	45 ^{bc}	44 ^b	
30 th day	N	10	4	23	27	19	0.0009
	%	17	16	37 ^{ab}	31 ^{ab}	28 ^b	

a: Statistically significant difference compared to control group (P<0.05)
 b: Statistically significant difference compared to the stress group (P<0.05)
 c: Statistically significant difference compared to the *Gundelia* group (P<0.05)
 N: Total number of entries to the open area.

According to Table 3, the percentage entering the open area on 15th day experiments were significantly reduced in the group with only immobilization stress compared to the control group (P<0.05). Only the *Gundelia tournefortii* L. group did not show statistical significance compared to the control group in terms of percentage entering the open area (P>0.05), while the *Gundelia tournefortii* L. + stress group had P<0.05 significant increase compared to the control group. The increase in percentage entering the open area in the fluoxetine group was not determined to

control group, the *Gundelia tournefortii* L. and *Gundelia tournefortii* L. + stress groups had significant increases in terms of percentages entering the open area (P<0.05). The increase in percentage entering the open area in the fluoxetine group did not reach statistical significance compared to the control group (P>0.05). The *Gundelia tournefortii* L., *Gundelia tournefortii* L. + stress and fluoxetine groups had increases in percentages entering the open area compared to the group only administered the immobilization stress model (P<0.05).

Table 4. Motor activity test results (s)

Days	Groups					P Values
	Control $\bar{X} \pm S_z$	Stress $\bar{X} \pm S_z$	<i>Gundelia</i> $\bar{X} \pm S_z$	<i>Gundelia</i> + Stress $\bar{X} \pm S_z$	Fluoxetine $\bar{X} \pm S_z$	
0 th day	60.00 ± 0.10	57.00 ± 2.10	57.25 ± 2.13	59.00 ± 1.00	59.75 ± 0.25	0.345
15 th day	56.63 ± 1.83	58.75 ± 1.25	60.00 ± 0.10	55.75 ± 2.11	57.63 ± 1.24	0.468
30 th day	60.00 ± 0.10	56.50 ± 2.41	58.63 ± 1.02	57.63 ± 1.63	60.00 ± 0.10	0.211

\bar{X} : Mean, S_z : Standard error

According to Table 4, the rotarod test results for the 0, 15th and 30th days determined exposure to chronic immobilization stress or *Gundelia tournefortii* L. extracts did not affect motor activity ($P>0.05$).

Table 5 gives the effect of chronic immobilization stress on liver and kidney tissue biomarkers.

group compared to the control and stress groups ($P<0.05$). ALT levels were statistically significantly increased in the fluoxetine group compared to the stress group, while TP levels were statistically significantly reduced in the Gundelia, Gundelia + stress and fluoxetine groups compared to the control group

Table 5. Effect of chronic immobilization stress on liver and kidney tissue biomarkers

Parameters	GROUPS					P Values
	Control $\bar{X} \pm S_x$	Stress $\bar{X} \pm S_x$	Gundelia $\bar{X} \pm S_x$	Gundelia + Stress $\bar{X} \pm S_x$	Fluoxetine $\bar{X} \pm S_x$	
AST (U/L)	96.50 ± 5.79	125.25 ± 11.67	149.75 ± 14.57	140.75 ± 11.51	227.43 ± 34.62 ^{ab}	0.001
ALT (U/L)	33.00 ± 2.03	33.63 ± 1.01	29.50 ± 0.98	37.00 ± 2.21	41.57 ± 4.77 ^b	0.024
ALP (U/L)	223.00 ± 12.53	252.30 ± 5.98	266.3 ± 9.43	261.50 ± 12.95	259.30 ± 32.90	0.474
CREAC (mg/dL)	0.53 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.269
UA (mg/dL)	2.78 ± 0.36	3.75 ± 0.78	3.04 ± 0.65	3.21 ± 0.45	2.96 ± 0.90	0.874
TP (g/dL)	72.00 ± 1.65	68.38 ± 1.31	67.13 ± 0.81 ^a	66.88 ± 0.35 ^a	64.86 ± 0.63 ^a	0.001
Albumin (g/dL)	35.33 ± 1.33	33.88 ± 0.93	31.88 ± 0.48 ^a	32.50 ± 0.33	32.43 ± 0.78	0.038

a: Statistically significant difference compared to control group ($P<0.05$)

b: Statistically significant difference compared to the stress group ($P<0.05$)

\bar{X} : Mean, S_x : Standard error

According to Table 5, there was no statistical change between Gundelia and Gundelia + stress groups compared to the control and stress groups in terms of AST levels, with a statistical increase in the fluoxetine

($P<0.05$). Additionally, there was a significant reduction in the Gundelia groups compared to the control group in terms of albumin levels ($P<0.05$). Additionally, ALP, UA and CRE levels in the experimental

Table 6. Effect of chronic immobilization stress of lipid peroxidation and the antioxidant defense system in liver tissue

Parameters	GROUPS					P Values
	Control $\bar{X} \pm S_x$	Stress $\bar{X} \pm S_x$	Gundelia $\bar{X} \pm S_x$	Gundelia + Stress $\bar{X} \pm S_x$	Fluoxetine $\bar{X} \pm S_x$	
SOD (U/mgp)	2106.41 ± 50.58	1745.90 ± 150.91 ^a	2012.82 ± 27.28	1952.59 ± 25.39	1965.41 ± 50.67	0.038
CAT (U/mgp)	163.98 ± 7.94	163.51 ± 10.65	131.03 ± 4.89	162.58 ± 6.52	154.02 ± 18.70	0.191
GST (U/mgp)	2.05 ± 0.15	1.51 ± 0.33	1.63 ± 0.18	1.56 ± 0.24	1.42 ± 0.23	0.265
GPX (U/mgp)	18.75 ± 3.37	21.99 ± 3.74	20.82 ± 3.79	27.43 ± 4.62 ^a	21.3 ± 3.87	0.007
GR (U/mgp)	0.61 ± 0.04	0.52 ± 0.08	0.37 ± 0.07 ^a	0.39 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.02 ^{ab}	0.001
GSH (µmol/mgp)	24.41 ± 0.63	19.29 ± 0.82	21.31 ± 1.08	19.69 ± 2.05	20.48 ± 1.69	0.094
MDA (nmol/mgp)	12.20 ± 0.42	24.50 ± 7.79 ^a	17.49 ± 1.67	21.8 ± 4.06	13.92 ± 0.91	0.039

a: Statistically significant difference compared to control group ($P<0.05$)

b: Statistically significant difference compared to the stress group ($P<0.05$)

\bar{X} : Mean, S_x : Standard error

Table 7. Effect of chronic immobilization stress on lipid peroxidation and antioxidant defense system in kidney tissue

Parameters	GROUPS					P Values
	Control $\bar{x} \pm S_x$	Stress $\bar{x} \pm S_x$	Gundelia $\bar{x} \pm S_x$	Gundelia + Stress $\bar{x} \pm S_x$	Fluoxetine $\bar{x} \pm S_x$	
SOD (U/mgp)	1947.78 ± 58.45	1966.74 ± 48.03	2033.39 ± 18.68	1956.70 ± 20.63	2026.65 ± 8.87	0.315
CAT (U/mgp)	33.69 ± 5.00	48.39 ± 8.05	23.16 ± 2.12 ^b	26.34 ± 2.12	34.71 ± 7.19	0.031
GST (U/mgp)	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.297
GPX (U/mgp)	33.92 ± 5.73	30.63 ± 5.16	29.41 ± 4.96	29.98 ± 5.05	27.23 ± 1.76 ^a	0.015
GR (U/mgp)	0.38 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.46 ± 0.04 ^b	0.26 ± 0.02 ^a	0.001
GSH (µmol/mgp)	12.44 ± 0.62	12.75 ± 1.01	16.29 ± 1.02 ^{ab}	14.14 ± 1.34	6.20 ± 0.26 ^{ab}	0.001
MDA (nmol/mgp)	65.46 ± 2.23	83.66 ± 1.90 ^a	69.62 ± 6.18	66.06 ± 4.24 ^b	75.02 ± 3.96	0.021

a: Statistically significant difference compared to control group (P<0.05)

b: Statistically significant difference compared to the stress group (P<0.05)

\bar{X} : Mean, S_x : Standard error

groups were not found to have any significant variation when compared with the control and stress groups (P>0.05).

Tables 6 and 7 give the lipid peroxidation and antioxidant defense system analysis results for liver and kidney tissue, respectively.

According to Table 6, in liver tissue SOD activity levels were significantly reduced in the stress group compared to the control group, while GPx activity levels were observed to have a statistical increase in the Gundelia + stress group compared to the control group (P<0.05). Additionally, GR activity levels in the fluoxetine, Gundelia and Gundelia + stress groups had a statistical reduction observed compared to the control group, while the fluoxetine groups also had a statistical decrease compared to the stress group (P<0.05). The MDA levels in the stress group were determined to be statistically significantly increased compared to the control group (P<0.05).

According to Table 7, in kidney tissue CAT activity levels were statistically low in the Gundelia group compared to the stress group, while GPx activity levels were statistically low in the fluoxetine group compared to the control group (P<0.05). GR activity levels were low in the fluoxetine group compared to the control group, with a statistical increase in the Gundelia + stress group compared to the stress group (P<0.05). GSH levels was statistically low in the fluoxetine group compared to both the control and stress groups, while there was a statistically significant increase identified in the Gundelia group compared to both the control and stress groups (P<0.05).

Discussion and Conclusion

In the elevated plus maze test, the open areas of the platform increase anxiogenic behavior. It is thought that agents with anxiolytic effect will increase the duration spent in these areas (Crawley and Goodwin, 1980; Belzung et al., 2001). For example, diazepam, an anxiolytic medication used clinically, increased duration spent in the open area and increased the number of entries into the open area (Crawley and Goodwin, 1980). The results of anxiety tests performed on the 15th and 30th days of the study show that *Gundelia tournefortii* L. caused significant anxiolytic effects in rats exposed to chronic stress. When compared with fluoxetine, used clinically with anxiolytic aims, *Gundelia tournefortii* L. appeared to show better anxiolytic effects than this medication. Different studies have reported that anxiolytic effects of plants are due to the combined effect of active materials, with flavonoids, especially, leading the list of these active materials (Coleta et al., 2006; Doukkali et al., 2016). The anxiolytic effects of flavonoids found in plants are reported to be due to modulation of the GABAergic system (Marder and Paladini, 2002). It is thought that the anxiolytic effect of *Gundelia tournefortii* L. is due to flavonoids contained in its structure.

In a study, the researchers stated that chronic restriction stress causes oxidative damage to tissues such as brain, kidney, liver. In addition, it was reported that various stress models decreased antioxidant enzyme activities and increased ROS production (Samarghandian et al., 2017). Similarly, according to the results of this study, experimentally-induced stress is understood to cause oxidative stress in liver and kidney tissue (Tables 6 and 7). Additionally, the

stress model developing due to immobilization stress applications was shown to cause increases and reductions in antioxidant levels and increased free radical production. Stress is considered to trigger ROS formation in mitochondria, peroxisomes, lysosomes, cytosol and plasma membranes in the body (Djordjevic et al., 2010).

Lipid peroxidation is known to be one of the basic causes of injury occurring in hepatocytes (Turan and Celik, 2016) and is due to imbalance forming between the oxidant-antioxidant systems (Yuan et al., 2013). According to present study results, fluctuations occurred in both MDA and enzyme activities and this situation caused cytotoxicity in liver and kidney tissues, leading to excessive free radical production in metabolism resulting in insufficient antioxidant defense mechanisms.

Enzyme systems within the defense system are effective against free radicals formed in the organism. SOD, CAT and GPx are among the most important enzymatic antioxidants preventing free radical accumulation and initiation of lipid peroxidation in the environment (Gutteridge, 1995; Halliwell and Gutteridge 1999; Valko et al., 2007). In this study, the experimentally-induced chronic stress caused an increase in lipid peroxidation and appeared to cause fluctuations in SOD, CAT and GPx activities and enzyme activities in both liver and kidney tissue to deal with this situation.

Davydov et al. (2004) stated that immobilization stress triggered free radical formation in the liver of elderly and adult rats. In parallel with this, in present study, the low SOD level in liver tissue showed superoxide radical formation rates were induced by immobilization stress. In this study, the decrease in GSH levels in the liver is in parallel with studies in this field. Studies by Zaidi et al. (2005) and Sahin and Gumuslu (2007) observed a decrease in GSH levels in liver tissue of rats exposed to immobilization stress.

The study observed increases and decreases in SOD, CAT, GR, GST and GPx activities. CAT may be said to detoxify based on H₂O₂ in kidneys. CAT shows antioxidant enzyme activity at high concentrations of H₂O₂, while GPx shows activity at lower concentrations of H₂O₂ (Jones and Kennedy, 1983), with CAT considered to show more activity than GPx in this tissue. According to present study results, CAT in kidney tissue showed more activity compared to GPx, with this result appearing to support previous studies (Jones and Kennedy, 1983).

The TP levels in *Gundelia*, *Gundelia* + stress and fluoxetine groups were statistically significantly reduced compared to the control group, which may be said to be caused by some metabolic disorders in the

liver damage. According to Bandyopadhyay et al. (1999), the majority of dissolved solid material in blood plasma is due to proteins. TP level in blood plasma or serum, 3.5-5 g/dL is serum albumin while 2.5-3.2 g/dL comprise globulins. The liver is an important tissue for the synthesis of serum proteins, and the level of serum proteins can be reduced in some liver and kidney diseases. For these reasons, some amino acids appear to be the main cause of metabolic dysfunction in oxidative injury in liver and kidney tissues.

Fluctuation in AST, ALT and ALP levels in the groups in present study change the transport and membrane permeability functions of these cells due to hepatocyte injury and as a result cause leakage of these enzymes. Enzymes like AST, ALT and ALP are released into blood after liver and kidney injury and this causes an increase in activity in serum samples (Gokcimen et al., 2007). Studies of ALT, AST and LDH enzymes reported that they are signs of cellular injury in situations where intracellular values are much higher than extracellular values or if there are increases in the amounts of these enzymes in plasma (El et al., 2002).

In this study, enzyme leakage occurring linked to injury cause an increase in uric acid and creatinine values in the stress, *gundelia* + stress and fluoxetine groups. Elevated uric acid levels are a common finding of chronic kidney disease. In the past, it was stated that elevated uric acid developed linked to reductions in excretion from the kidneys, while currently it was revealed that uric acid simultaneously has an active role in the formation and progression of kidney injury (Borges et al., 2010). As markers of kidney functions, urea, creatinine, BUN and uric acid levels are measured in blood. These measurements provide information about kidney functions (Soliman et al., 2007). Serum urea, creatinine and uric acid levels caused by the reduction in glomerular filtration are proposed to begin to elevate linked to increases in tubular reabsorption (Erdem et al., 2012).

According to the results of this study, *Gundelia tournefortii* L. showed strong anxiolytic effect. Serum biochemical analysis results showed that *Gundelia tournefortii* L. does not affect blood biochemistry when used alone or with chronic immobilization stress; however, fluoxetine used clinically for anxiolytic aims elevated serum enzymes and lowered total protein and albumin ratios. Additionally, fluoxetine appeared to lower lipid peroxidation levels. In both tissues, chronic immobilization stress appeared to cause both increases and decreases in enzyme activity levels. These results support the study by Zafir and Banu (2007). In this study fluoxetine was identified to lower lipid peroxidation and protein oxidation levels in depressive patients.

Many studies have shown that limited stress causes oxidative stress and thus causes imbalance in antioxidant status (Kovacheva-Ivanova et al., 1994; Oishi et al., 1999). Chronic immobilization stress is a good model to observe the formation of oxidative stress occurring in rat tissues. According to present results, administration of *Gundelia* plant extract and fluoxetine with immobilization stress affected antioxidant enzyme activities and was understood to cause lipid peroxidation in tissues and trigger free radical formation. Immobilization stress was observed to increase lipid peroxidation in both liver and kidney tissue, while *Gundelia tournefortii* L. and fluoxetine lowered lipid peroxidation.

In conclusion, chronic immobilization stress caused oxidative stress in liver and kidney tissue and administration of *Gundelia tournefortii* L. and fluoxetine was understood to have positive effects on enzyme activity and MDA levels during injury to these tissues. The study data shows that *Gundelia tournefortii* L. and fluoxetine used as antidepressant had beneficial effects against the oxidative injury caused by experimentally-induced stress. Additionally, *Gundelia tournefortii* L. was identified not to affect motor activity, but had anxiolytic effect according to the elevated plus maze test results.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare within this article.

References

- Aebi H. Catalase. In: Bergemeyer HU (ed) Methods of Enzymatic Analysis. Academic. Press, New York -London. 1974; 673-84.
- Ali SN, Ahmad MK, Mahmood R. Sodium chlorate, a herbicide and major water disinfectant byproduct, generates reactive oxygen species and induces oxidative damage in human erythrocytes. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017; 24(2):1898-909.
- APPI. American Psychiatric Pub Incorporated Diagnostic and statistical manual of mental disorders:DSM-V.[<https://psychiatryonline.org/pbassets/dsm/update/>]. Data of access: 01.01.2018.
- Asadi-samani M, Rafieian-Kopaei M, Azimi N. *Gundelia*: a systematic review of medicinal and molecular perspective. *Pak J Biol Sci* 2013; 16(21):1238-47.
- Asgary S, Movahedian A, Badiei A, Naderi Amini GF, Hamidzadeh Z. Effect of *Gundelia tournefortii* on some cardiovascular risk factors in animal model. *J Med Plants* 2009; 7: 112-9.
- Aykac A, Suer K, Taskiran C. Models of rat behavior used for studies of anxiety. *Marmara Medical Journal* 2015; 28(1): 1-7.
- Azeez OH, Kheder AE. Effect of *Gundelia tournefortii* on some biochemical parameters in dexamethasone-induced hyperglycemic and hyperlipidemic mice. *Iraqi J Vet Sci* 2012; 26: 73-9.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Sci* 1999; 658-66.
- Barbieri A, Palma G, Rosati A, Giudice A, Falco A, Petrillo A, Bimonte S, Benedetto M, Esposito G, Stiuso P, Abbruzzese A, Caraglia M, Arra C. Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumour growth. *J Cell Mol Med* 2012; 16(4):920-6.
- Barnett SA. The rat: a study in behavior. New Jersey: Transaction Publishers. 2007.
- Belzung C, Le Guisquet AM, Barreau S, Calatayud F. An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine induced anxiogenic-like effects in mice. *Behav Pharmacol* 2001; 12: 151-62.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61(5):882-8.
- Borges RL, Ribeiro AB, Zanella MT, Batista MC. Uric acid as a factor in the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 113-9.
- Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants. *Psychopharmacology* 2002; 163:121-41.
- Buyukdereli Z. To evaluate the effect of thrombocyte stimulating factor antagonist application on cognitive and motor abilities in newborn rats with hypoxic ischemic brain injury. Thesis, Mersin University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Mersin, Turkey. 2008.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113:484-90.
- Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cortim MD, Lima TC, Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytother Res* 2006; 20(12):1067-73.
- Coruh N, Celep AS, Ozgokce F, Iscan M. Antioxidant capacities of *Gundelia tournefortii* L. extracts and inhibition on glutathione-S-transferase activity. *Food Chem* 2007; 100(3):1249-53.
- Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simp-

- le animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 13: 167-70.
- Davydov VV, Zakharchenko IV, Ovsyannikov VG. Free radical processes in the liver of adult and old rats during stress. *Bull Exp Biol Med* 2004; 137: 139-42.
- Dias PM, Changarath J, Damodaran A, Joshi MK. Compositional variation among black tea across geographies and their potential influence on endothelial nitric oxide and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 6655-68.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A, Radojicic MB. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiol Res* 2010; 59(5): 729-36.
- Dong K, Wu M, Liu X, Huang Y, Zhang D, Wang Y, Yan LJ, Shi D. Glutaredoxins concomitant with optimal ROS activate AMPK through S-glutathionylation to improve glucose metabolism in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2016; 101: 334-47.
- Doukkalil Z, Kamal R, Jemeli ME, Nadjmouddine M, Zellou A, Cherrah Y, Alaoui K, Taghzouti K. Anti-Anxiety Effects of Mercurialis 608 Annu Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. *Pharmaceutical Bioprocessing* 2016; 609(4): 52-7.
- Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Michel JB. Study of the hypoglycaemic activity of *Lepidium sativum* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacology* 2005; 97: 391-5.
- El S, Salem E, Abdel R. In vitro hepatotoxicity of alachlor and its by-product. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 31-5.
- Erdem E, Ozdemir A, Kaya C, Karatas A, Cengiz K. Serum Uric Acid Levels in Chronic Kidney Disease. *Firat Medicine Journal* 2012; 17(1): 23-7.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002; 22(5): 1592-9.
- Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I. Effects of DZN at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pest Biochem Physiol* 2007; 87: 103-8.
- Gulati K, Chakraborti A, Ray A. Differential role of nitric oxide (NO) in acute and chronic stress induced neurobehavioral modulation and oxidative injury in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92(2): 272-6.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
- Haghi G, Hatami A, Arshi R. Distribution of caffeic acid derivatives in *Gundelia tournefortii* L. *Food Chem* 2011; 124: 1029-35.
- Halabi S, Battah AA, Aburjai T, Hudaib M. Phytochemical and antiplatelet investigation of *Gundelia tournefortii*. *Pharm Biol* 2005; 43: 496-500.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, New York. 1999; 246-351.
- Hamdan LL, Afifi FU. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(1): 117-21.
- Hammadi SK, Salam AJ. Hypolipemic effect of *Kuub* (*Gundelia tournefortii* A.) oil and clofibrate on lipid profile of atherosclerotic rats. *Veterinarski Arhiv* 2004; 74: 359-69.
- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38: 1539-43.
- Jamshidzadeh A, Fereidooni F, Salehi Z, Niknahad H. Hepatoprotective activity of *Gundelia tourenfortii*. *J Ethnopharmacol* 2005; 101: 233-7.
- Jones DP, Kennedy FG. Function of glutathione peroxidase in decomposition of hydrogen peroxide in isolated liver and heart cells. In *Functions of Glatathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical dspects* In: Larsson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B, (Eds.), *Functions of Glutathione*. Raven Press, New York. 1983; 109-16.
- Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current Neurovascular Res* 2008; 5(1): 71-81.
- Kessler RC, Sonnega A. Posttraumatic stress disorder in the national comorbidity survey. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52: 1048-60.
- Kovacheva-Ivanova S, Bakalova R, Ribavov SR. Immobilization stress enhances lipid peroxidation in the rat lungs. *Gen Physiol Biophys* 1994; 13: 469-82.
- Kurt M, Celik S, Kesim Y. The Role of dopaminergic system in motor coordination. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2002; 19(1): 15-24.

- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4: 118-26.
- Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione S-transferase (Human Placenta). *Methods Enzymol* 1981; 77: 231-5.
- Marder M, Paladini AC. GABA (A)-receptorligands of flavonoid structure. *Current Topics in Med Chem* 2002; 2: 853-67.
- Matthäus B, Özcan MM. Chemical evaluation of flower bud and oils of tumbleweed (*Gundelia tournefortii* L.) as a new potential nutrition sources. *J Food Biochem* 2011; 35: 1257-66.
- Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5512-6.
- Oishi K, Yokoi M, Maekawa S, Sodeyama C, Shiraishi T, Kondo R, Kuriyama T, Machida K. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand* 1999; 165: 65-9.
- Oryan S, Nasri S, Amin G, Kazemi-Mohammady M. Anti nociceptive and anti-inflammatory effects of aerial parts of *Gundelia tournefortii* L. on NMRI male mice. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2011; 12: 8-15.
- Pedreanez A, Arcaya JL, Carrizo E. Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. *Physiol Behav* 2011; 104(5):1002-9.
- R Core Team: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.
- Salim S, Asghar M, Taneja M, Hovatta I, Chugh G, Vollert C, Vu A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. *Brain Res* 2011; 1404: 63-71.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 87: 223-9.
- Soliman KM, Abdul-Hamid M, Othman AI. Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Med Sci Monit* 2007; 13: 73-83.
- Starevic V, Linden M, Uhlenhuth EH, Kolar D, Latas M. Treatment of panic disorder with agoraphobia in an anxiety disorders clinic: factors influencing psychiatrists' treatment choice. *Psychiatry Res* 2004; 125: 41-52.
- Sahin E, Gumuslu S. Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 2007;144(4):342-7.
- Turan A, Celik I. Antioxidant and hepatoprotective properties of dried fig against oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Int J of Biol Macromol* 2016; 91: 554-9.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 322-8.
- Yang L, Wang M, Guo YY, Sun T, Li YJ, Yang Q, Zhang K, Liu SB, Wu YM. Systemic inflammation induces anxiety disorder through CXCL12/CXCR4 pathway. *Brain Behav Immun* 2016; 56: 352-62.
- Yuan Y, Wu SJ, Liu X, Zhang LL. Antioxidant effect of salidroside and its protective effect against furan-induced hepatocyte damage in mice. *Food Funct* 2013; 4(5):763-9.
- Yurt B, Celik I. Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chem Toxicology* 2011; 49(2): 508-13.
- Zafir A, Banu N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint -stressed rats. *Eur J of Pharmacology* 2007; 572: 23-31.
- Zaidi SM, Al-Qirim TM, Banu N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R&D* 2005; 6: 157-65.



Tüketime Hazır Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması

Serhat AL¹, Mukaddes BAREL¹, Adalet DIŞHAN¹, Fulden KARADAL², Harun HIZLISOY¹,
Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹, Yeliz YILDIRIM¹, Zafer GÖNÜLALAN¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Veteriner Halk Sağlığı ABD, Kayseri-TÜRKİYE

²Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Bor Meslek Yüksek Okulu Süt ve Ürünleri Teknolojisi ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Serhat AL; E-posta: serhatal@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2721-9275

Atıf yapmak için; Al S, Barel M, Dışhan A, Karadal F, Hızlısoy H, Ertaş Onmaz N, Yıldırım Y, Gönülalan Z. Tüketime hazır gıdalarda *Listeria monocytogenes* varlığının araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 149-155.

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ve Niğde'de perakende olarak satışa sunulan bazı tüketime hazır gıdalarda *Listeria monocytogenes* varlığının araştırılması, tespit edilen izolatların moleküler karakterizasyonu ve antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı dönemlerde olmak üzere farklı satış noktalarından 64 etsiz çiğ köfte, 54 mayonez bazlı Rus salatası ve 25 peynir tatlısı örneği toplanmıştır. Tüketime hazır gıda numunelerinden konvansiyonel yöntemlerle *Listeria monocytogenes* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *Listeria* spp. şüpheli izolatlar Microbact *Listeria* 12L Kit ile tür bazında tanımlanmıştır. Fenotipik olarak *L. monocytogenes* olduğu belirlenen izolatlar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanmıştır. *Listeria monocytogenes* izolatlarının klonal yakınlıkları Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PZR ile belirlenmiş, ayrıca Multiplex PZR (mPZR) yöntemi ile nesil ve serotip analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında etsiz çiğ köfte numunelerinin sekizinden (%12.5) ve Rus salatası örneklerinin ise birinden (%1.85) *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Araştırılan peynir tatlısı örneklerinin hiçbirinde *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Yapılan ERIC PZR analizi sonucunda izolatların dört farklı tipte bant profili ortaya koydukları belirlenmiştir. *L. monocytogenes* izolatlarının nesillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan Allelspesifik Oligonükleotid (ASO) PZR analizinde tüm izolatların birinci nesile ait oldukları; mPZR ile yapılan serotiplendirmede ise tüm izolatların 4b serotipi olduğu ortaya konulmuştur. Çalışma kapsamında elde edilen sekiz izolatın birinin ampisiline; birinin meropenem, üçünün eritromisine ve ikisinin ise trimetoprim/sülfometaksazol'e dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu çalışma ile halk sağlığı açısından ciddi riskler oluşturan ve etkin kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gösterebilen *L. monocytogenes*'in tüketime hazır gıdalar aracılığıyla dağılımı gösterebileceği belirlenmiştir. Toplum tarafından talep gören tüketime hazır gıdaların üretiminde, gıda güvenliği yönetim sistemlerinin etkin şekilde kullanılması ve üretim sonrasında olası kontaminasyonların önüne geçilmesi amacıyla gıda muhafaza ilkelerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, *Listeria monocytogenes*, moleküler tiplendirme, tüketime hazır gıdalar

Investigation of the Presence of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods

Summary: In this study, it was aimed to investigate the presence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods retailed in Kayseri and Niğde province of Turkey and to determine the molecular characterization and antibiotic resistance profiles of the detected isolates. For this purpose, 64 cigköfte without meat, 54 mayonnaise based Russian salads and 25 cheese desserts samples were collected from different sales points. *Listeria monocytogenes* isolation was carried out by conventional method in ready-to-eat food samples. Obtained *Listeria* spp. isolates were identified by species with the Microbact *Listeria* 12L Kit. Isolates phenotypically determined as *L. monocytogenes* were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR). Clonal relationship of *L. monocytogenes* isolates were revealed by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR, and lineage and serotype analyzes were performed by Multiplex PCR (mPCR) methods. Disc diffusion method was used to determine the antibiotic susceptibility profiles of the isolates. In the study, *L. monocytogenes* was isolated in eight of çiğköfte samples (12.5%) and one of Russian salad samples (1.85%). None of the cheese dessert samples were contaminated with *L. monocytogenes*. As a result of the ERIC PCR analysis, it was determined that the isolates separated four different type of band profiles. In the Allelespecific oligonucleotide (ASO) PCR analysis performed to determine the lineage of *L. monocytogenes* isolates, it was revealed that all isolates belong to the Lineage I, and serotyping with mPCR, all isolates were determined as serotype 4b. One of the eight isolates obtained in the study was resistant to ampicillin; one was resistant to meropenem, three to erythromycin and two to trimethoprim/sulfamethoxazole. Within the study, it was determined that antibiotic resistant *L. monocytogenes*, can be distributed with ready-to-eat foods and poses serious risks in terms of public health. It is considered that food preservation principles should be taken into consideration and using food safety management systems effectively in the production process of ready-to-eat foods that are highly demanded by the society to prevent possible contaminations after production.

Key words: Antibiotic susceptibility, *Listeria monocytogenes*, molecular typing, ready-to-eat foods

Giriş

Listeria monocytogenes, özellikle yaşlılar, hamile kadınlar ve yeni doğanlar da dahil olmak üzere yüksek riskli gruplarda enfeksiyonlara neden olabilen Gram pozitif, çubuk şekilli, fakültatif anaerob bir bakteridir. Listeriozis, *Salmonella*, *Campylobacter* veya verotoksijenik *Escherichia coli* gibi diğer gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar kadar yaygın olmasa da, yüksek mortalite ile seyretmesi nedeniyle ciddiyetini korumaktadır. Listeriozis, insanlarda septisemi, meningoensefalit, hamilelerde abort veya neonatal enfeksiyonları şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Charlier ve ark., 2017). Bununla birlikte *L. monocytogenes*, yüksek düzeyde çevresel kontaminasyon gösterebilen ubiquiter bir mikroorganizma olarak, ham madde eldesi ve sonrasında çapraz kontaminasyonlar ile üretim, paketleme, nakliye ve depolama gibi aşamalarda gıda üretim zincirine kolaylıkla dahil olabilmektedir (Amajoud ve ark., 2018). Bu patojen bakterisi düşük nem içeriği, yüksek tuzluluk oranı, geniş pH aralığı gibi durumlarda ve soğuk zincirde canlılığını uzun süre koruyabilmekte ve gıda işleme ile ilişkili stres faktörlerine karşı oldukça yüksek tolerans gösterebilmektedir (Chen ve ark., 2020; Cartwright ve ark., 2013). Tüm bu koşullar, pastörize edilmemiş süt ürünleri, et ürünleri, deniz ürünleri ve sebzeler gibi çok çeşitli gıda matrislerinde *L. monocytogenes*'in canlılığını devam ettirmesini ve çoğalmasını sağlamaktadır. Salgınlar ve sporadik listeriozis vakaları, genellikle uzun raf ömrüne sahip, buzdolabında muhafaza edilebilen ve tüketilmeden önce ısı işlem uygulanmayan tüketime hazır gıdalar ile ilişkilendirilmektedir (EFSA, 2018).

Listeria türleri içerisinde *L. monocytogenes*'in (ve nadiren *L. ivanovii*'nin) insanlar ve hayvanlar için patojen olduğu ve üç nesil halinde sınıflandırıldığı bildirilmektedir. Nesil I'nin 4b, 1/2b, 3b ve 3c serotiplerini; nesil II'nin 1/2a, 1/2c, ve 3a serotiplerini ve nesil III'ün ise 4a ve 4c serotiplerini içerdiği ortaya konmuştur (Nadon ve ark., 2001). Bununla birlikte birinci ve ikinci nesil, barındırdıkları serotipler ile insan ve hayvanlarda patojenite gösterebilirken III. nesilin insan listeriozisi ile etiyolojik ilişkisinin oldukça zayıf olduğu bildirilmektedir (Ward ve ark., 2004; Jeffers ve ark., 2001).

Bu çalışma ile hassas grup bireylerde ölümlerle sonuçlanabilen enfeksiyonlara neden olan *L. monocytogenes*'in tüketime hazır gıdalarda varlığının (i); elde edilen izolatların klonal yakınlıklarının (ii); nesil ve serotip dağılımlarının (iii) ve antibiyotik duyarlılık profillerinin (iv) ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Tüketime hazır gıda numunelerinin örneklendirilmesi

Çalışma kapsamında Mayıs-Haziran 2018 aylarında

Kayseri ve Niğde'de bulunan bazı satış yerlerinden üretim tarihleri ve parti numaraları gözetilerek birer haftalık aralıklarla 64 etsiz çiğ köfte, 54 Rus salatası ve 25 peynir tatlısı örneği toplandı. Kendi ambalajında bulunan örnekler direkt kendi ambalajıyla; diğer tipteki numuneler ise sızdırmaz steril numune poşetlerine alındı. Tüm örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek aynı gün analize tabi tutuldu.

Çalışmada kullanılan pozitif kontroller

Çalışmada elde edilen şüpheli izolatların doğrulanmasında; *L. monocytogenes* N7144, nesil belirlenmesi ve serotiplendirmede ise *L. monocytogenes* RSKK 472 ve RSKK 476 referans suşları kullanıldı. Nesil II için ise Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi kültür koleksiyonunda bulunan daha önce doğrulanmış, *L. monocytogenes* klinik olarak elde edilmiş insan izolatu kullanıldı.

Listeria monocytogenes izolasyonu ve identifikasyonu

Çalışma kapsamında temin edilmiş gıda numunelerinde *Listeria* spp. varlığının belirlenmesi amacıyla ISO 11290-1/2017 horizontal metodu takip edildi (ISO, 2017). *Listeria monocytogenes* şüpheli koloniler Gram boyama ve hareket muayenesine tabi tutuldu. ISO kapsamında yapılması zorunlu kılınan biyokimyasal testler için kanlı agarda ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültüre edilmiş izolatlar, Microbact 12L test kiti (Oxoid, İngiltere) ile biyokimyasal (Esculin, Mannitol, Ksiloz, Arabitol, Ribose, Rhamnose, Trehalose, Tagatose, Glucose-1-Phosphate, Methyl-D-Glucose, Methyl D-Mannose, Hemolysis) açıdan değerlendirildi.

Moleküler Karakterizasyon

DNA izolasyonu

Kanlı agarda taze kültüre edilmiş şüpheli izolatlardan total genomik DNA izolasyonu Instagene Genomic DNA Ekstraksiyon kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılarak üretici firmanın önermiş olduğu protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen gDNA konsantrasyonları (ng/µL) Qubit 3.0 fluorometre (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak belirlendi ve PCR analizleri gerçekleştirilene kadar gDNA izolatları -20 °C'de muhafaza edildi.

Listeria monocytogenes izolatlarının PZR ile doğrulanması

Çalışma kapsamında elde edilmiş olan *L. monocytogenes* izolatlarının doğrulanması amacıyla Border ve ark. (1990) tarafından bildirilmiş olan primer çifti kullanıldı (Tablo 1). Çalışmada gerçekleştirilen tüm PZR analizlerinde DreamTaq Hot Start PCR (2x) Master Mix (Thermo Fisher, ABD) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı. DNA amplifikasyonunda 95°C'de 2

Tablo 1. Çalışma kapsamında kullanılan primerler

Kullanım amacı	Primer	Dizi (5'-3')	Ürün (bp)	Literatür
<i>L. monocytogenes</i> doğrulanması	LM1	CCTAAGACGCCAATCGAA	702	Border ve ark. (1990)
	LM2	AAGCGCTTGCAACTGCTC		
Nesil belirlenmesi	actA1-f	AATAACAACAGTGAACAAAGC	373	Ward ve ark. (2004)
	actA1-r	TATCACGTACCCATTTACC		
	plcB2-f	TTGTGATGAATACTTACAAAC	564	
	plcB2-r	TTTGCTACCATGTCTTCC		
	actA3-f	CGGCGAACCATACAACAT	277	
	plcB3-r	TGTGGTAATTTGCTGTCC		
Serotip belirlenmesi	lmo0737-f	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	Doumith ve ark. (2004)
	lmo0737-r	ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
	lmo1118-f	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	
	lmo1118-r	CGGCTTGTTCCGTCATACTTA		
	ORF2819-f	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	471	
	ORF2819-r	CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
	ORF2110-f	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	
	ORF2110-r	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
	prs-f	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	
	prs-r	CAAAGAAACCTTGATTTGCGG		

30 dakika ön denatürasyon işleminden sonra 95 °C'de 30 saniye, 54 °C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika (35 siklus) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama uygulandı (Arctic™ Thermal Cycler; Thermo Fisher, USA). Çalışmanın tamamında elde edilen ampliconlar GelRed Nükleik Asit Jel Boyası (Biotium, USA) ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jelle yüklenerek 120 voltta 45 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu ve Chemidoc XRS+ jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad, ABD) ile görüldü.

Allelspezifik Oligonükleotid (ASO) PZR

Çalışma kapsamında elde edilmiş olan *L. monocytogenes* izolatlarının nesillerinin belirlenmesi amacıyla Ward ve ark., (2004) tarafından dizayn edilmiş primer çiftleri kullanılarak mPZR analizi gerçekleştirildi (Tablo 1). Bu amaçla gerçekleştirilen amplifikasyonda; 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon işleminden sonra 95°C'de 30 saniye, 53°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika (35 siklus) ve 72°C'de 10 dakika son uzama uygulandı (Arctic™ Thermal Cycler; Thermo Fisher, USA).

Serotiplendirme

Listeria monocytogenes izolatlarının serotiplendirilmesinde Doumith ve ark., (2004) tarafından ortaya konulmuş mPCR protokolü takip edildi (Tablo 1). Bu amaçla gerçekleştirilen amplifikasyonda; 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon işleminden sonra 95°C'de 30 saniye, 56°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika (35 siklus) ve 72°C'de 10 dakika son uzama uygulandı (Arctic™ Thermal Cycler; Thermo Fisher, USA).

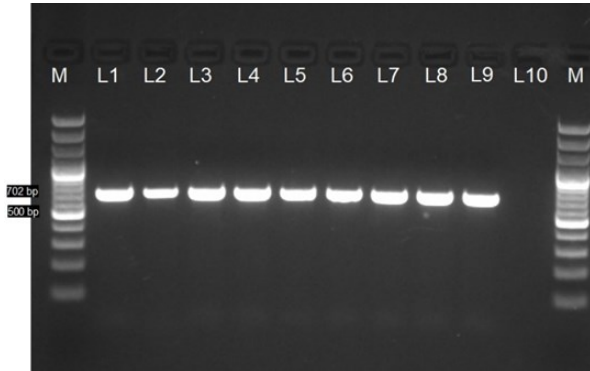
Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PZR

Çalışmada izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının klonal yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla Versalovic ve ark. (1991) tarafından bildirilmiş ERIC PZR primer çifti (ERIC-1, ERIC-2) ve protokolü takip edildi (Tablo 1). Amplifikasyon sonrası elde edilen PZR ürünleri, %2'lik agaroz jelle 1 saat elektroforeze tabi tutuldu ve oluşan bant profilleri jel dökümantasyon sisteminde (Image Lab Software 6.0; Bio-Rad, ABD) analize tabi tutuldu. Bant profillerinin benzerlik indekslerinin belirlenmesi amacıyla açık erişimli DendroUPGMA uygulaması kullanıldı (Garcia-Vallve ve

Tablo 2. Tüketime hazır gıdalardan elde edilen *Listeria* spp. izolatlarının türler bazında dağılımı

Gıda	N	İzolatların tür dağılımı (%)				
		<i>L. monocytogenes</i> *	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivonovii</i>	<i>L. grayi</i>
Etsiz çiğköfte	64	7 (10.9)	2 (3.12)	4 (6.25)	1 (1.56)	2 (3.12)
Rus salatası	54	1 (1.85)	2 (3.70)	-	1 (1.85)	2 (3.70)
Peynir tatlısı	25	-	-	-	-	-

N: Numune sayısı; *: PCR ile doğrulanan veriler; -: Tespit edilmedi.



Şekil 1. *Listeria monocytogenes* izolatlarının doğrulanması amacıyla elde edilen jel elektroforez görüntüsü M: Moleküler marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Thermo, ABD); L1: *L. monocytogenes* N7144; L2-L8: *L. monocytogenes* çiğköfte izolatları; L9: *L. monocytogenes* Rus salatası izolatı; L10: Negatif Kontrol (Distile su)

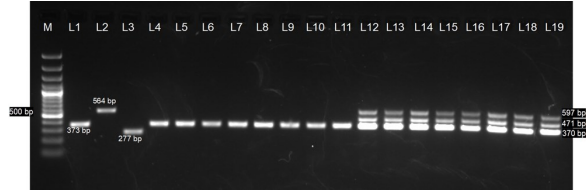
ark., 1999). Normalleştirmeden sonra, en üst pozisyona dayalı profil benzerlikleri, 100 tekrarlı olarak Jaccard benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen Newick formatından dendogramın görselleştirilmesi için, açık erişimli iTOL (versiyon 5) programı kullanıldı (Letunic ve Bork, 2019).

Antibiyotik duyarlılık testi

İzolatların antibiyotik duyarlılık profilleri Avrupa Antimikrobiyel Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından önerilen disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (EUCAST, 2018). Bu amaçla ampisilin (2 mg), meropenem (10 mg), eritromisin (15 mg) ve trimetoprim-sulfametoksazol (1.25-23.75 mg) diskleri kullanıldı.

Bulgular

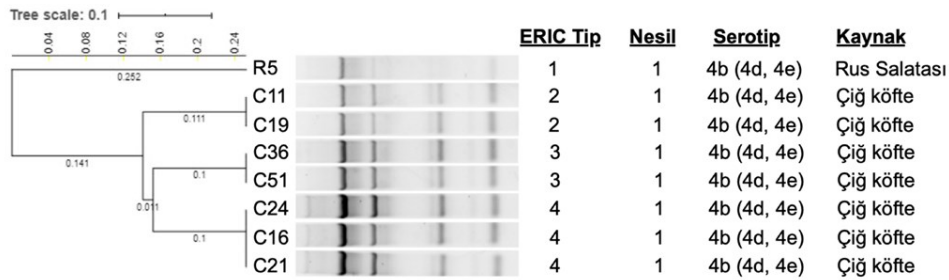
Çalışmada incelenen 64 etsiz çiğköfte numunesinin 16'sından, 54 Rus salatası numunesinin ise altısından (%11.1) *Listeria* spp. izole edildi. İncelenen peynir numunelerinde ise *Listeria* spp. kontaminasyonu



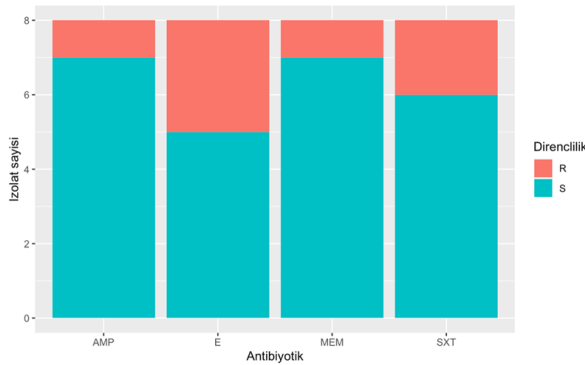
Şekil 2. *Listeria monocytogenes* izolatlarının nesil ve serotiplerinin belirlenmesinde elde edilen jel elektroforez görüntüsü. M: Moleküler marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Thermo, ABD); L1: *L. monocytogenes* RSKK 472 (Nes 1); L2: *L. monocytogenes* insan izolatı (Nes 2); L3: *L. monocytogenes* RSSK 476 (Nes 3); L4-L10: *L. monocytogenes* çiğköfte izolatları (Nes 1); L11: *L. monocytogenes* Rus salatası izolatı (Nes 1); L12-L18: *L. monocytogenes* çiğköfte izolatları (4b); L19: *L. monocytogenes* Rus salatası izolatı (4b)

belirlenmedi. *Listeria* spp. olarak izole edilen tüm şüpheli izolatlar *L. monocytogenes* açısından değerlendirildi. Yapılan incelemede etsiz çiğ köfte izolatlarının yedisi (%10.9); Rus salatası izolatlarının ise biri (%1.85) *L. monocytogenes* olarak doğrulandı. Çalışma kapsamında biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanan *Listeria* türlerinin dağılımı Tablo 2'de; *L. monocytogenes* izolatlarının elektroforez görüntüsü ise Şekil 1'de gösterilmektedir.

Moleküler ve biyokimyasal yöntemlerle ile doğrulanan *L. monocytogenes* izolatlarının ASO PCR ve mPCR ile sırasıyla nesil ve serotip analizleri gerçekleştirildi. İncelenen sekiz izolatın tamamının birinci nesile dahil olan 4b serotipi olduğu ortaya kondu. Nesil ve serotip belirlenmesi sonucu elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 2'de gösterilmektedir. Elde edilen izolatların klonal yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ERIC PCR analizinde izolatların dört ayrı ERIC tipte dağılım gösterdikleri belirlendi. Yapılan analiz ile çiğköfte izolatlarının, Rus salatası izolatından farklı olarak aynı kümede üç ayrı ERIC tipte oldukları belirlendi. ERIC PCR ile elde edilmiş olan dendogram ve izolatların genel özellikleri Şekil 3'de verilmektedir.



Şekil 3. *L. monocytogenes* izolatlarının ERIC PCR profilleri ve bazı özellikleri



Şekil 4. *Listeria monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik durumları. AMP: Ampisilin (2 mg), MEM: Meropenem (10 mg), E: Eritromisin (15 mg) ve SXT: Trimetoprim-sulfometaksazol (1.25-23.75 mg); R: Dirençli; S: Duyarlı

Çalışmada yapılan antibiyotik duyarlılık analizleri neticesinde, birer izolatin ampisiline ve meropeneme dirençli oldukları belirlendi. Üç izolatin eritromisine ve ikisinin ise trimetoprim/sulfametoksazol'e dirençli oldukları belirlenmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık profillerini gösteren grafik Şekil 4'de gösterilmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Listeria monocytogenes, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde ciddi, sporadik enfeksiyonlara neden olan önemli bir etkidir. Düşük bir insidensle görülmesine rağmen listeriozisin risk grubunda bulunan bireylerde yaklaşık %30'lara varan ölüm oranına sebep olması hastalığın ciddiyetini ortaya koymaktadır (Rantsiou ve ark., 2008; Hein ve ark., 2001). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC, ABD) tarafından yayınlanan rapora göre 2017-2019 yılları arasında ABD'de 24 listeriozis salgını gelişmiş, salgınlarda 22 bireyin hastanede tedavi edildiği ve iki vakanın ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (CDC, 2020). *Listeria* spp. kaynaklı enfeksiyonların büyük çoğunluğunun (%99) gıda kaynaklı olduğu ve özellikle çocuklar, yaşlılar, immun-supresif hastalar ve hamileler gibi hassas grup bireylerde invaziv listeriozis prognozunun oldukça kötü olduğu vakalarda önemli düzeyde ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir (Schlech, 2000). Bu sebepten ötürü gelişmiş ülkelerin çoğunda olduğu gibi Türkiye'de de *L. monocytogenes* Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde "Sıfır Tolerans" olarak sınıflandırılmış ve 25 g gıda numunesinde bulunmaması gerekliliği bildirilmiştir (TGK, 2011).

Çalışmada incelenen çiğ köfte örneklerinin % 10.9'unun, Rus salatası örneklerinin ise 1.85'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Gürler ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada 49 çiğköfte örneğinde *L. monocytogenes* tespit edilmişken, Rus salatası örneklerinin %8.6'sında be-

lirlenmiştir. Mercanoğlu Taban (2012) tarafından yapılan çalışmada ise etsiz çiğköfte örneklerinin % 17.1'inin *L. monocytogenes* pozitif olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise etsiz çiğ köfte numunelerinde %1.4 düzeyinde *L. monocytogenes* kontaminasyonu olduğu bildirilmektedir (Ghazzi ve ark., 2018). Balıkesir bölgesinden toplanan tüketime hazır gıdaların incelendiği bir çalışmada 20 Rus salatası ve 15 adet peynir tabanlı hoşmerim tatlısında da bu çalışma ile paralel olarak, *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir (Gökmen ve ark., 2016). Bu çalışmaların büyük çoğunluğunda Türkiye'de tüketime hazır gıdaların *L. monocytogenes* açısından halk sağlığını tehdit ettiği görülmektedir. Bu sebeple ilgililer tarafından üretim hatları ve perakende satış yerlerinde gıda denetimlerinin sıklaştırılması gerekmektedir.

Gıda kaynaklı listeriozis salgın ve vaka sayılarının etkili olarak azaltılabilmesi için etkenin epidemiyolojik ve ekolojik özelliklerinin moleküler seviyede belirlenmesi ve kaynak-etken ilişkisinin bilimsel olarak açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu sebeple ülke genelinde gıdalardan ve çevresel örneklerden izole edilen etkenlerin akrabalıklarının belirlenmesi, alt tiplendirme yöntemleri ile etkenin moleküler olarak karakterize edilmesi önem taşımaktadır. Artan moleküler çalışmalar, listeriozise sebep olan etkenin nesil ve serotip özelliklerine bağlı olarak konak spesifite ve patojenite bakımından değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının insan listeriozisinde sorumlu nesil ve serotipik özellikte olup olmadığının belirlenmesi önemli hale gelmiştir. İnsan listeriozisin başlıca sorumlusu olarak birinci nesilden gelen *L. monocytogenes* 4b serotipi olduğu ancak nesil I'e mensup serotip 1/2b ve nesil II'ye mensup serotip 1/2a'nın da bazı salgınlara yol açtığı bilinmektedir (Orsi ve ark., 2011). Bu sebepten ötürü çalışmada izole edilen *L. monocytogenes*'lerin insanlarda listeriozisin en önemli serotipi olan 4b olarak tanımlanmış olması halk sağlığı açısından endişe vericidir.

Bu çalışma bulguları, Kayseri ve Niğde'de bulunan perakende satış yerlerinden toplanan bazı tüketime hazır gıdaların *L. monocytogenes*'le kontaminasyon düzeylerini ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonlarını ortaya koymaktadır. Bu çalışmada ısıtma işlemi uygulanmadan direkt olarak tüketilen gıdalarda *L. monocytogenes* kontaminasyonu saptanması, söz konusu ürünlerin listeriozise ilişkin tehlike arz ettiklerini ortaya koymaktadır. Özellikle yüksek düzeyde çevresel kontaminasyon gösteren *Listeria* türlerinin gıda üretim tesislerinde, gıda işleme prosesinin her basamağında gıdaları kontamine edebileceği düşünülmektedir. HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) ve SOPs (Sanitation Standard Operating Procedures) gibi gıda güvenliği yönetim sistemlerinin gıda zincirinin başından sonuna kadar ciddiye takip edilmesi gerekmektedir. Gıda üretiminde kaliteli hammadde kullanılması, toplama, işleme, taşıma ve satış

esnası dahil tüm hat boyunca hijyenik kurallara uyulması, işlenmiş ürünlerin doğru muhafaza edilmesi ve gıda ile temasın bulunduğu tüm ortamlarda hijyen prensiplerinin uygulanması gerekmektedir. Ayrıca gıda zincirinin her basamağında rol alan personelin, gıda güvenliği konusunda akademik uzmanlıkları bulunan bireyler tarafından periyodik olarak eğitime tabii tutulması hususunda otorite tarafından adımlar atılmalıdır.

Kaynaklar

- Amajoud N, Leclercq A, Soriano JM, Bracq-Dieye H, El Maoudi M, Senhaji NS, Abrini J. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. *Food Control* 2018; 84: 436-41.
- Border PM, Howard JJ, Plastow GS, Siggins KW. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1990; 11(3): 158-62.
- Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves L.M, Silk BJ, Mahon BE. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1-9.
- Centers for disease control and prevention (CDC). Outbreak of *Listeria* Infections Final Update. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-08-19/index.html>. Accessed Date: Mayıs 2020.
- Charlier C, Perrodeau É, Leclercq A, Cazenave B, Pilmi, B, Henry, Dieye, HB. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *The Infect Dis* 2017; 17(5): 510-9.
- Chen Y, Chen M, Wang J, Wu Q, Cheng J, Zhang J, Pang, R. Heterogeneity, Characteristics, and Public Health Implications of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods and Pasteurized Milk in China. *Front Microbiol* 2020; 11: 642.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3819-22.
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J* 2018; 16 (1): p. 5134.
- Garcia-Vallve S, Palau J, Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol* 1999; 16(9): 1125-34.
- Ghazzi, M, Porto-Fett AC, Ayaz ND, Ozansoy G, Çufaoğlu G, Goncuoglu M, Stahler LJ. Microbiological characterization of çiğ köfte sold at retail in Ankara, Turkey, and evaluation of selected antimicrobials as ingredients to control foodborne pathogens in çiğ köfte during refrigerated storage. *Food control* 2018; 84: 138-47.
- Gökmen M, Akkaya L, Kara R. Balıkesir'de satışa sunulan bazı tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*'in yaygınlığı. *Van Vet J* 2016; 27(1): 31-6.
- Gurler Z, Pamuk S, Yıldırım Y, Ertas N. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2015; 196: 79-83.
- Hein I, Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E, Wagner M. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res Microbiol* 2001; 152: 37-46.
- International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part 1: Detection method. 2017;11290-1.
- Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL, Scarlett J, Boor JK, Wiedmann M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* 2001; 147: 1095-104.
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(1): 256-9.
- Mercanoğlu Taban B. *Listeria monocytogenes* in çiğ köfte without meat: A novel bulgur ball product. *J Food Agric Environ* 2012; 10(2): 130-2.
- Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2704-7.
- Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International J Med Microbiol* 2011; 301(2): 79-96.
- Rantsiou K, Alessandria V, Urso R, Dolci P, Cocolin L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 99-105.
- Schlech W. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis* 2000; 31: 770-5.
- The European Committee on Antimicrobial Suscepti-

bility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2018; 8.1. <https://eucast.org/> Accessed Date: August 2018.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmî Gazete Sayı: 28157 <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6-1.pdf>. Erişim tarihi: Mayıs 2020.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res* 1991; 19: 6823-31.

Ward TJ, Gorski L, Borucki MK, Mandrell RE, Hutchins J, Papedis K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol Res* 2004; 186(15): 4994-5002.



Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi*

Görkem EKEBAŞ¹, Ayhan ATASEVER¹, Meryem ŞENTÜRK², Duygu YAMAN GRAM¹, Meryem EREN²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Görkem EKEBAŞ; E-mail: gekebas@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-9094-677X

Atıf Yapmak İçin: Ekebaş G, Atasever A, Şentürk M, Yaman Gram D, Eren M. Ratlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine nar çekirdeği yağının etkisi ve kaspaz aktivitesi ile hepatic apoptozisin belirlenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(2):156-163.

Özet: Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda nar çekirdeği yağının (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi, hücrel apoptozda kaspaz aktivasyonları, serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin, total kolesterol düzeyleri ve karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyi değerlendirildi. Çalışmada 32 adet rat, her grupta 8 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol olarak belirlendi. İkinci gruba 4 hafta her gün 2 ml/kg/canlı-ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen 1.0 ml/kg/canlı-ağırlık iki doz CCl₄ ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal olarak enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg/canlı-ağırlık dozunda NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken ilk hafta 3 gün ara ile 2 doz intraperitoneal 1 ml/kg/canlı-ağırlık, dilüe edilmiş CCl₄ uygulandı. Kontrol gruplarında normal karaciğer doku yapısı gözlenirken; CCl₄ grubunda hepatositlerinde yoğun makro ve mikroveziküler yağlanma, portal bölgede ve parankimde çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyon alanları ile nekrotik değişiklikler görüldü. NÇY uygulamalarında histopatolojik değişiklikler CCl₄ grubuna göre kısmen azalırken, kaspaz 3 ve 9 aktivitesi de sınırlı sayıda azaldı. CCl₄ ile artış gösteren ALT aktivitesi NÇY uygulaması ile önemli düzeyde düşüş (P<0.05), serum total protein değerlerinde artış (P<0.001) gözlemlendi. CCl₄ uygulanması karaciğer MDA düzeyini önemli düzeyde artırırken (P<0.001), NÇY'nin uygulamaları istatistiksel olarak önemli etkilemedi. Sonuç olarak; CCl₄ ile birlikte NÇY verilen deney gruplarında karaciğer hasarına karşı histopatolojik değişiklikler üzerinde olumlu etkisi gözlenmemesine karşın, bazı biyokimyasal değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, kısmen iyileştirici bir etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara yansımadağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, immunhistokimya, karbon tetraklorür, nar çekirdeği yağı, rat

The Effects of Pomegranate Seed Oil on Acute Liver Damage Induced Carbon Tetrachloride in Rats and Determination of Hepatic Apoptosis and Caspase Activity

Summary: In this study, the protective effect of pomegranate seed oil (PSO) on liver tissue lesions in rats induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in acute liver injury, caspase activations in cellular apoptosis, serum Alanine Amino Transferase (ALT) activity, triglyceride, total protein, albumin, total cholesterol levels, and liver malondialdehyde (MDA) levels were evaluated. Thirty-two rats were divided into four groups as 8 rats in each group. The first group was determined as control. The second group was given 2 ml/kg/body-weight PSO gavage daily for 4 weeks. In the third group, 1.0 ml/kg/body-weight of two doses of CCl₄ diluted 1:1 with corn oil was injected intraperitoneally at 3 days intervals in the first week. The fourth group received 2 ml/kg/body-weight PSO every day for 4 weeks by gavage and 2 doses intraperitoneally 1 ml/kg/body-weight, diluted CCl₄ at 3 days intervals in the first week. While normal liver tissue structure was observed in the control groups; In the CCl₄ group, intense macro and microvesicular steatosis of hepatocytes, mononuclear cell infiltration areas mostly composed of lymphocytes in the portal region and parenchyma and necrotic changes were observed. Histopathological changes in PSO applications were partially decreased compared to the CCl₄ group, while caspase 3 and 9 activity decreased to a limited number. ALT activity increased with CCl₄ and decreased with PSO application (P<0.05) and increased serum total protein values (P<0.001). While the administration of CCl₄ significantly increased liver MDA levels (P<0.001), it was not significantly affected by the application of PSO. As a result; although there was no positive effect on histopathological changes against liver damage in experimental groups given PSO with CCl₄ since it brings the biochemical values closer to the control group values, it is thought that it may have a partially curative effect, but this improvement does not reflect the damage in liver tissue.

Key words: Carbon tetrachloride, histopathology, immunohistochemistry, pomegranate seed oil, rat

Geliş Tarihi/Submission Date : 07.01.2020
Kabul Tarihi/Accepted Date : 09.06.2020

*Bu çalışma "Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi" isimli doktora tezinin bir kısmından özetlenmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2016-6790 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Giriş

Akut ve kronik hepatotoksisite oluşturmak amacıyla kullanılan CCl₄'ün toksisitesi, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu

bilinmektedir (Recknagel ve ark., 1989). Oluşan serbest radikal türevleri, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonu oluşturarak etki göstermektedirler (Basu, 2003; Recknagel ve ark., 1989).

Doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluşturan fenolik maddeler; flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir (Moure ve ark., 2001; Naczek ve Shahidi, 2004). Lipid oksidasyonun geciktirilmesi bakımından biberiye, adaçayı, kekik, keten tohumu yağı, sarımsak, zeytin yaprağı, nar çekirdeği ve çay ekstraktları bileşimlerdeki fenolik bileşiklerden dolayı doğal antioksidan olarak kullanılmaktadırlar (Namiki, 1990). Günümüzde halk hekimliğinde hastalıklardan korunmak için, nar (*Punica granatum*) orta doğudaki birçok kültürde kullanılmaktadır (Gurib-Fakim, 2006). Nar suyunun, kabuğunun ve yağının, değişik mekanizmalarla çok sayıda terapötik yarar sağlaması ile birlikte birçok araştırmacı hücre siklusunu, invazyon ve anjiyogenez engelleyerek antikarsinojen, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere odaklanmıştır (Lansky ve Newman, 2007). Nar suyundaki temel antioksidanlardan fenolik yapıdaki hidrolize edilebilir antosiyaninler, polifenoller, kateşinler, gallik ve ellagik asitler olup, bu antioksidanlar nitrik oksidin oksidatif yıkımını önleyerek etki ederken, anti-inflamatuvar etkilerinin de olduğu görülmüştür (Noda ve ark., 2002).

Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl_4) ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, Nar Çekirdeği Yağı (*Punica granatum Oleum*)'nın (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi, hücre apoptozun immunohistokimyasal yöntemle [anti kaspaz 3 (aktif), 8 ve 9 antikorları] değerlendirilmesi ve serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri ile karaciğer Malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan nar çekirdeği yağı (NÇY), ticari olarak BÜKAŞ firmasından temin edilmiştir. Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesinden 13.01.2016 tarihinde 16/008 sayılı onay alındı. Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250g ağırlığında, 32 adet Wistar albino rat kullanıldı. Her grupta 8 hayvan olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız karbon tetraklorür dozunu Gram Yaman ve ark., (2018)'nin çalışmasına göre 1.0 ml/kg/canlı ağırlık CCl_4 olarak belirlerken, NÇY dozları ise Melo ve ark., (2015) ve Sarıca ve Liman (2016)'nin çalışmalarına göre 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda belirlendi. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve % 0.9 NaCl (1ml/kg/canlı ağırlık); ikinci gruba 4 hafta her gün sırası ile 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda

NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen 1.0 ml/kg/canlı ağırlık iki doz CCl_4 ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken ilk hafta 3 gün ara ile 2 doz intraperitoneal (ip) 1 ml/kg/canlı ağırlık, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl_4 uygulandı. Çalışma gruplarındaki ratların son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler 80 mg/kg ketamin (alfamine, 100 mg/ml, Ata-Fen) ve intraperitoneal 12 mg/kg ksilazin (alfazyne, 20 mg/ml, Ata-Fen) (Green ve ark., 1981) ile anestezisi sağlandıktan sonra göğüs ve karın boşlukları açılıp, intrakardiyak kan örnekleri antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüplere alınarak nekropsileri yapıldı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Alınan tüm doku örnekleri ışık mikroskopik incelemeler için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonuna konuldu (Luna, 1968). Karaciğer dokusunun bir kısmı MDA belirlenmesi amacıyla çalışma gününe kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Ayrılan plazma ve serumlar analiz için $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. Serum ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde ticari kitler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ticari kit (Cayman, USA) kullanılarak ELISA cihazında (μ Quant Bio-Tek) belirlendi. Doku takip işlemleri tamamlanan karaciğer ait doku örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5- μ m kalınlığında kesitler lamlara alındı. Rutin Hematoksilen-Eosin (HxE) ile boyandı (Luna, 1968) Dokulardaki kaspaz aktivitesini göstermek için Streptavidin Biotin Kompleks Peroksidaz (ABC-P) tekniği, ticari kitle (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak anti caspase-3 (aktif) (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000), anti caspase-8 (Abcam ab25901) (sulandırma oranı 1/100) ile anti caspase-9 (Abcam ab25758) (sulandırma oranı 1/100) kullanıldı. Negatif kontrol olarak dokulara PBS (pH 7.4), pozitif kontrol olarak primer antikorların üretici firmalarının önerdiği kontrol dokularına primer antikorlar uygulandı. Pozitiflik DAB kromojen ile tespit edildi. Zemin için Mayer Hematoksilen kullanıldı. Yağ boyası için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda saklanan karaciğer dokuları, Osmium tetroksit (OsO_4) solüsyonuna aktarıldı. 8 saat bu solüsyonda bekletilerek yağ dokusunun tespit olması sağlandıktan sonra rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek HxE boyama yapıldı (Luna, 1968). Hematoksilen-Eosin ile boyanan kesitlerde hepatositlerde yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif yöntemde, her karaciğer için her bir kesitte 10 farklı alanda 10'luk ve 20'lik objektifte sayılıp sözü edilen her bir hasar parametresi ikişer patolog tarafından ortalama değer alınarak

skorlandı ve yüzdelik değerler hesaplandı. Yağlanma eğer karaciğer hücrelerinin %33'ünden az ise 1 (hafif), %33-66 arası ise 2 (orta) ve %66'dan fazla ise 3 (şiddetli) olarak kabul edildi. İnflamasyon, nekroz ve fibrosis 0-3 arasında derecelendirildi (yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3). Biyokimyasal verilerin istatistiki analizleri ve karaciğer yangı yağlanma nekroz ve fibrosis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığına Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı.

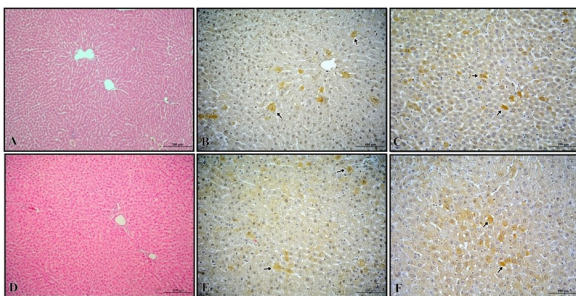
Bulgular

Klinik bulgular

Çalışmada; kontrol ve NÇY gruplarındaki ratlarda herhangi bir klinik bulgu görülmezken, CCl₄ ve CCl₄+NÇY gruplarındaki ratlarda en belirgin olarak halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, sendeleyerek yürüme ve aşırı tükürük salgısı gibi klinik bulgular gözlemlendi.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgular

Kontrol (Grup 1) ve NÇY (Grup 2) grupları; ratların histopatolojik muayenesinde karaciğer doku örneklerinin normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 1 A,D). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Gruplara ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrosis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo 1). Karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerinde Kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazma kahverengi boyanmış olduğu görüldü (Şekil 1 B,C,E,F)



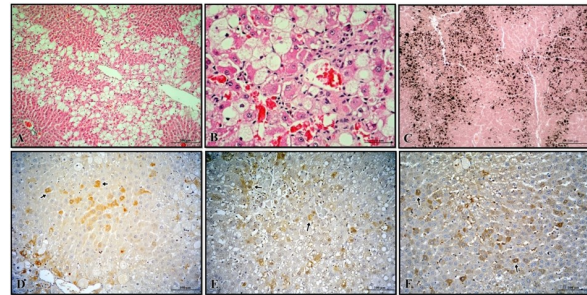
Şekil 1. A. Kontrol grubu, D. Nar çekirdeği yağ grubu, karaciğerlerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE, x100. B. Kontrol grubu, E. Nar çekirdeği yağ grubu, hepatositlerin kaspaz 3 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200. C. Kontrol grubu, F. Nar çekirdeği yağ grubu, hepatositlerin kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

Karbon tetraklorür grubu (Grup 3); karaciğer doku kesitlerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü (Şekil 2A). Bu vakuoller parankimdeki hepa-

tositlerin çoğunda saptandı. Bu alanlarda remark kordonları yapısı bozulmuştu. Özellikle portal bölgelere yakın alanlarda, lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyonları ile kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanları görülürken (Şekil 2B), seyrek olarak benzer hücre infiltrasyonlarına yağlanma alanlarının periferinde ve aynı zamanda homojen bir görünüm göstermediği için tam olarak sınıflandıramayan geniş nekrotik alanlarda da dikkati çekmiştir. Nekrotik alanların tüm parankime yayıldığı ve pembe homojen bir kitleye dönüştüğü görülmüştür. Bu alanlarda hepatositlerin stoplazmalarında mikroveziküler yağ vakuelleri belirgin olarak dikkati çekmekteydi. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 1).

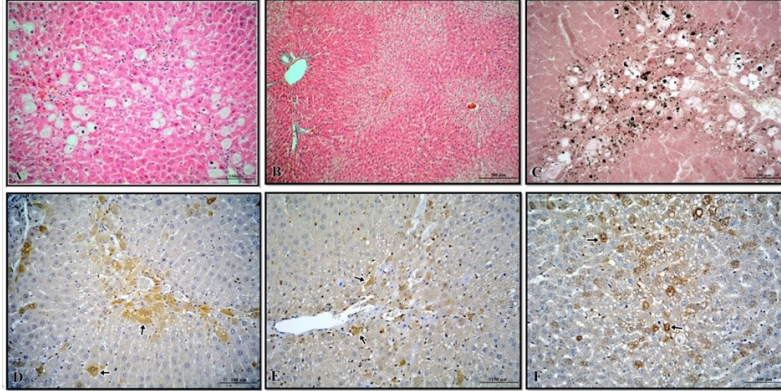
Karaciğer doku kesitlerine yağ boyası (Osmium tetroksit method for fat) ile hepatosit sitoplazmalarında makro-mikro yağ vakuellerinin siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 2C).

Karaciğer doku kesitlerinin immunhistokimyasal değerlendirilmesinde; yağ vakuelleri bulunan hepatositlerin periferinde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 immunpozitif hepatositler tespit edildi. Pozitif hücrelerde hepatosit sitoplazmalarının kahverengi boyandığı gözlemlendi (Şekil 2 D,E,F).



Şekil 2. A-B. Karbon tetraklorür grubu ratların hepatositlerinde yoğun makro ve mikro veziküler yağ vakuelleri, nekrotik alanlarda lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyonu ile kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE, x100, x400. C. Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuellerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO₄ fikse edilmiş) HxE, x100. D. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, E. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

Karbon tetraklorür+nar çekirdeği yağ grubu (Grup 4); karaciğer dokularının histolojik incelemesinde iki farklı lezyon dikkati çekti. İlki CCl₄ ile birbir örtüşen görüntü idi. Bu grupta yine hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü. Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı (Şekil 3A). Özellikle yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları görüldü. Bu alanlarda damarlar hiperemikti. İkinci görüntü-



Şekil 3. A. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde yağlanmanın görünümü. B. Hepatositlerde daha küçük yağ vakuelleri ve parankimde geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, Hx E, x200, x100. C. Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuellerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO₄ fikse edilmiş) Hx E, x200. D. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, E. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

de ise lezyon şiddetinde herhangi bir azalma olmaksızın yağ vakuelleri daha küçük olup, parankimde net olarak sınırları belli olmayan geniş nekroz alanları içerisinde yer almaktaydı (Şekil 3B). Nekroz alanları içerisinde lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları dikkati çekti. Bu alanlarda damarlarda hiperemi daha belirgindi. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu, CCl₄ grubu ile benzer olduğu görüldü (Tablo 1).

Karaciğer kesitlerine yağ boyası ile makro-mikro yağ vakuellerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 3C).

Karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; yağ vakuelleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde ve bu bölgedeki damar çevrelerinde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 immunpozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 3D,E,F).

Biyokimyasal bulguları

Çalışmada gruplara ait serumdan ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol ile karaciğer dokusundan MDA aktiviteleri düzeyleri Tablo 2'de verildi.

Kontrol ve NÇY grupları arasında serum ALT aktivitesi yönünden istatistiki anlamda bir fark belirlenmedi. Karbon tetraklorür uygulanan grupta karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artan serum ALT aktivitesi, NÇY'nın uygulaması ile önemli düzeyde düşüş (P<0.05) göstermiş olup, normal değerlere döndü (Tablo 2). Karaciğer hasarı oluşturulan hayvanlarda NÇY uygulaması serum total protein değerlerinde azalmaya neden oldu (P<0.001). Gruplar arasında serum albümin değerleri yönünden istatistiki önemde bir fark saptanmadı (P>0.05). Karbon tetraklorür uygulaması ile oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artış gösteren serum total kolesterol düzeyleri (P<0.01) NÇY uygulamasından etkilenmedi. Karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda serum trigliserit düzeyleri önemli düzeyde (P<0.01)

Tablo 1. Akut deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü

Gruplar	CCl ₄ (N=8)	Medyan(%25; %75 Yüzdalık)			İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Test)
		KONTROL (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl ₄ (N=8)	
Yangı	2.0 ^b (1.0-3.0)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.75-3.0)	P<0.001
Yağlanma	3.5 ^b (3.0-4.0)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	3.5 ^b (3.0-4.0)	P<0.001
Nekroz	3.0 ^b (2.75-3.00)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.75-2.25)	P<0.001
Fibrozis	2.0 ^b (2.0-2.25)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	1.0 ^b (1.0-1.25)	P<0.001

^{a-b}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdellik)				İstatistik Önem Kont- rolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl ₄ (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl ₄ (N=8)	
ALT(U/L)	68.0 ^a (65.0;81.5)	103.0 ^b (69.5;190.5)	64.0 ^a (59.0;68.0)	65.0 ^a (59.0;126.0)	P<0.05
Total Protein(g/dL)	6.4 ^b (6.1;6.5)	5.7 ^a (5.6;5.9)	6.6 ^b (6.4;6.8)	6.4 ^b (6.0;6.5)	P<0.001
Albümin(g/dL)	4.0 (3.9;4.1)	4.1 (3.9;4.2)	4.1 (4.0-4.3)	3.9 (3.7-4.0)	P>0.05
Total kolesterol (mg/dL)	66.0 ^a 58.5;71.0	73.0 ^b 72.5; 77.2	69.5 ^a 64.0;76.0	72.0 ^b 68.25;80.50	P<0.01
Trigliserit (mg/dL)	95.5 ^a (72.7; 107.5)	220.0 ^b (107.5; 239.0)	97.0 ^a (67.5;130.5)	128.5 ^b (95.0; 151.0)	P<0.01
MDA (µmol/mg protein)	21.6 ^a (20.1-23.4)	35.4 ^b (24.3-38.3)	22.2 ^a (19.5-24.3)	25.8 ^b (25.3-28.3)	P<0.001

^{a-b}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

artış gösterdi. Bu hayvanlara NÇY uygulanması, artmış trigliserit düzeylerini sayısal olarak düşürdü (Tablo 2).

Karaciğer MDA düzeyleri yönünden kontrol ve NÇY grupları arasında istatistiki anlamda bir fark saptanmadı. Karbon tetraklorür uygulanması karaciğer MDA düzeylerini kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artırdı (P<0.001), ancak bu artışlar NÇY'nin akut uygulamalarından istatistiki önemde etkilenmedi (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

Antioksidan içerikli bitkisel kaynaklı bileşiklerin toksik ve yan etkilerinin az olmasından dolayı, farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı karaciğeri koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar popüler hale gelmiştir (Parajuli ve ark., 2013; Schinella ve ark., 2010).

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl₄'ün akut uygulandığı çalışmalarda (Ali ve ark., 2010; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) karaciğer kesitlerinde hepatosit sitoplazmalarında yağ vakuol oluşumları, remark kordonlarının bozulmasına bağlı interstisyel ödem, V. centralis'lerde ve sinüzoidal alanlarda konjesyon, fokal nekroz, yangı hücre infiltrasyonu şekillendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da CCl₄'ün ilk hafta iki doz halinde 3 gün ara ile 1 ml/kg intraperitoneal yolla uygulanması sonucunda karaciğerde sentrilobüler ve parankimde net olarak sınıflandırılmayan geniş nekroz alanları, çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve özellikle

sentrilobüler bölgede daha yoğun olmak kaydıyla tüm parankimde hepatositlerde büyüklükleri farklı, keskin kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin gözlenmesi, CCl₄'ün farklı dozları kullanılarak akut karaciğer hasarı oluşturan yukarıdaki araştırmacıların (Ali ve ark., 2010; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) bulguları ile birebir örtüşmüştür. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ve oluşan hasarın nar çekirdeği yağı (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015) nar çekirdeği ekstresi (Yang ve ark., 2011) nar kabuğu ekstresi (Osman ve ark., 2011) ve nar suyunun (Shaban ve ark., 2014) iyileştirici etkisini araştırmış çalışmalarda vardır. Melo ve ark. (2015) ve Gram ve ark. (2018) karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı verdiği grupta hafif ve orta derecede mikro ve makro vakuoller gözlenirken, ortalarında nötrofil infiltrasyonu ve kanama odakları bulunan nekrozları bildirmişlerdir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, iyileştirmek amacıyla Yang ve ark. (2011) nar çekirdeği ekstraktı vermiş, yağ vakuollerinin ve yangı hücrelerinin sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Nar kabuğu ekstresi veren araştırmacılar Osman ve ark. (2011) da sentriasiner hepatositlerde oluşan vakuoller dejenerasyon, steatozis ve nekroz ile bu alanlardaki fokal mononükleer yangısal hücre infiltrasyonlarının şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise CCl₄+NÇY grubunda karaciğer lezyonlarından makro-mikro veziküler yağ vakuol oluşumları çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve nekroz alanları ile remark kordonlarının yapısının bozulması, damarlarda hiperemi gibi bozukluklar CCl₄ grubundakine benzerlik göstermiştir. Benzer şekilde bazı çalışmalarda (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark.,

2015) nar çekirdeği yağının iyileştirici etki gösterip göstermediği tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak sunulan çalışmada karaciğer hasarının nar çekirdeği yağının verilmesi ile tam olarak düzelmediği görülmüştür.

Karbon tetraklorür karaciğer de nekrozu tetiklese de, çoğunlukla hepatositlerdeki mitokondriyal fosfolipid tabakasını yok edip kaspaz 3'e bağlı apoptozu tetiklemektedir (Domitrović ve ark., 2013; Tao ve ark., 2012). Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl₄'ün uygulanan in vitro ve in vivo çalışmalarda, karaciğer hücrelerinde apoptozu belirlemek için yapılan kaspaz aktivitesini içeren immunohistokimyasal bulgular mevcuttur (Chan ve ark., 2014; Domitrović ve ark., 2013; Liu ve ark., 2014; Tao ve ark., 2012; Xie ve ark., 2015). Bu çalışmalardan; Domitrović ve ark. (2013), Liu ve ark. (2014), Chan ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) kaspaz 3 aktivitesinin arttığını, Liu ve ark. (2014) çalışmasında kaspaz 8 aktivitesinin herhangi bir değişiklik görmediğini, Chan ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) ise kaspaz 8 aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca Liu ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinde de artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Araştırmacıların sonuçlarında CCl₄'ün neden olduğu aşırı reaktif oksijen türevleri oluşumu; endojen antioksidan enzimlerini tüketmekte ve kaspaz 3, 8 ve 9 gibi enzimlerin aktif olarak hepatosit apoptozisini tetiklediğini, bu durumun CCl₄ toksikasyonunda hem instrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak hepatositlere apoptoza götürdüğü ve yıkımı gerçekleştirdiği bizim çalışmamızda da elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Karaciğer hasarı oluşturma da CCl₄'ün ve farklı toksik maddelerin uygulandığı, nar çekirdeği ekstraktı (İbrahim ve ark., 2016) ve nar suyunun (Shaban ve ark., 2014) iyileştirme ve apoptozun tetiklenmesindeki engelleme etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda İbrahim ve ark. (2016), CCl₄ uyguladığı gruplarda kaspaz 3 pozitif hepatositlerin kontrol grubuna göre sayısı yoğun şekilde artarken, CCl₄ ile birlikte nar çekirdeği ekstresi verilen gruptaki pozitif hepatosit sayısı yoğunluğu CCl₄ grubuna göre hafif bir azalma gösterdiğini, Shaban ve ark. (2014) diethylnitrosamine ve phenobarbital ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar suyu uyguladığı gruplardaki kaspaz 3 aktivitesini, kontrol grubu seviyelerine indirdiğini, bildirmişlerdir. Ancak her iki yazar da apoptoza giden hepatositlerde kaspaz 8 ve 9 ile ilgili herhangi bir veri bildirmemişlerdir. Sunulan çalışmada da CCl₄ toksikasyonu ile ilgili akut karaciğer yıkım aşamasında hepatositlerde gözlenen apoptoz kaspaz 3, 8, 9 da immun-pozitif tespit edilirken, nar çekirdeği yağı uygulamasıyla kaspaz 3, 8, 9'daki apoptoza giden immun-pozitif hepatosit yoğunluğunun kısmen azaldığı görülmüştür.

Karbon tetraklorür ile oluşturulan akut (Kumar ve ark., 2009; Sumalatha ve ark., 2016) çalışmalarda oluşan

karaciğer hepatosit hasarına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulmasıyla kan dolaşımına geçişleri artan ALT enziminin, serum aktivitelerinde anlamlı yükselmeler dikkati çekmektedir. Karaciğer hasarının karakteristik bulgusu olan protein düzeylerindeki azalmaları çalışmalarında bildiren araştırmacılar da vardır (Zeashan ve ark., 2008). Sunulan çalışmada araştırmacıların (Ali ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2009) bulgularıyla uyumlu olarak CCl₄'e bağlı olarak görülen serum total protein ve albümin düzeylerindeki azalmaların, bu toksik maddenin endoplazmik retikulumdaki poliribozomları bozarak karaciğerde protein sentezini aksatmasından (Ali ve ark., 2010; Zeashan ve ark., 2008) kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Hasarlı karaciğerin belirlenmesinde serum kolesterol düzeylerindeki artıştan da yararlanılabileceği bildirilmektedir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan çalışmalarda (Botsoglou ve ark., 2009; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) karaciğer hücre hasarı sonrasında kolesterolün dolaşıma geçmesi sebebiyle serumdaki düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Sunulan çalışmada da yukarıdaki araştırmacıların (Botsoglou ve ark., 2009; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) çalışmalarıyla uyumlu olarak akut CCl₄ ile oluşan karaciğer hasarında serum total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde artış belirlenmiştir.

Malondialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak membran denatürasyonu ve peroksidasyona yol açan hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açar (Niki ve ark., 2005). Akut (Shenoy ve ark., 2001, Yehia ve ark., 2013) CCl₄ uygulamasıyla oluşturulan karaciğer hasarında araştırmacılar karaciğer MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde sunulan çalışmada da akut olarak CCl₄ verilen ratlarda belirlenen karaciğer MDA düzeylerindeki artışlar, CCl₄'ün karaciğer endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzimi aracılığıyla toksik karakterde CCl₃ ve CCl₃O₂ serbest radikallerine dönüşmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun sonucu şekillenen doku hasarı ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliğinden (Shenoy ve ark., 2001) ileri gelebilir.

Karbon tetraklorür ile ratlarda oluşturulan akut karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla nar çekirdeği yağı verilerek yapılan çalışmalarda (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015) toksisiteye bağlı olarak artan serum ALT aktivitesi ile MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015), azalan serum total protein düzeylerinin de arttığı (Gram ve ark., 2018) bildirilmiştir. Diğer yandan Yehia ve ark. (2013) da CCl₄ ile oluşturduğu toksikasyonda nar suyunun, artan ALT aktivitesi ile MDA düzeylerini azalttığını tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, CCl₄ (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015; Yehia ve ark., 2013) ile karaciğer hasarı oluşturulan çeşitli araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak,

CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına bağlı artış gösteren ALT enzim aktivitesi NÇY uygulanması ile önemli düzeyde düşmüştür (P<0,01), azalan serum total protein düzeyleri de Gram ve ark. (2018)'nin bulgularına benzer şekilde artmıştır. Ancak karaciğer MDA düzeyleri ile serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri NÇY uygulamasından etkilenmemiştir.

Sunulan çalışmada nar çekirdeği yağının akut CCl₄ toksikasyonu ile ilgili karaciğer hasarına iyileştirici yönde sınırlı etkisi gözlenmiştir. Karbon tetraklorür ve haricindeki diğer toksik materyaller ile yapılan toksikasyonlara karşı, nar kullanılan çalışmalarda (Shaban ve ark., 2014; Yang ve ark., 2011; Yehia ve ark., 2013) narın iyileştirme özelliği ile ilgili sonuçları bu konuda klasik bilgiler veren (Lansky ve Newman, 2007; Noda ve ark., 2002) çalışmalarla örtüşmektedir. Nar çekirdeği yağının içeriğindeki flavonoid ve fenolik bileşenlerinden ileri gelen antioksidan aktivitesine punisik asit başta olmak üzere, linoleik ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitlerine bağlı olarak (Saha ve ark., 2012) NÇY uygulaması ile akut dönemde CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarı sonucu artan serum ALT enzim aktivitesinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalması ile karaciğer hasarı sonucu azalan serum total protein düzeylerinin artmasının yanında, karaciğer MDA, serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin etkilenmemesi karaciğer dokusundaki hasarın düzelmeyeceğini gösterdiği olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak: sunulan çalışmada kullanılan 2 ml/kg nar çekirdeği yağının, CCl₄ ile karaciğerde oluşturulan histopatolojik değişiklikler kısmen azaltırken, genel olarak incelenen biyokimyasal değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, sınırlı bir iyileştirici etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara tam olarak yansımadağı düşünülmektedir. Nar çekirdeği yağının elde edilmesinde kullanılan bu bitkilerin kısımları (kabuk, meyve, çekirdek), elde edilen ürünlerin çeşidi (ekstrakt, yağ, su) ile yetiştikleri toprağın yapısı gibi etkenlere bağlı olarak içeriklerinin farklılığına, farklı işleme teknikleri ile hayvanların bireysel duyarlılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Nar çekirdeği yağı yağının farklı sürelerde ve herhangi bir yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarının kullanılarak dokular üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

Ali SA, Rizk MZ, Ibrahim NA, Abdallah MS, Sharara HM, Moustafa MM. Protective role of Juniperus phoenicea and Cupressus sempervirens against CCl₄. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2010; 1 (6): 123-31.

Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189: 113-27.

Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E, Zervos I, Kokoli A, Christaki E, Nikolaidis E. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J Sci Food Agric 2009; 89: 1397-406.

Chan CC, Lee KC, Huang YH, Chou CK, Lin HC, Lee FY. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. J Gastroenterol Hepatol 2014; 29(3), 603-13.

Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, Cvijanović O, Pugel EP, Štefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food Chem Toxicol 2013; 51: 370-8.

Gram DY, Atasever A, Eren M. Effect of pomegranate (Punica granatum) seed oil on carbon tetrachloride-induced acute and chronic hepatotoxicity in rats. J Pharmacogn Phytochem 2018; 10(2): 124-9.

Green Cj, Kneight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: A 10 year experience. Lab Anim 1981; 15: 163-70.

Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27(1): 1-93.

Ibrahim MAR, Okail HAM, Emam NMM. Ameliorative effects of pomegranate peel extract on hepatotoxicity Induced by carbon tetrachloride in mice. I J Res Stud Biosci 2016; 4(10): 23-31.

Kumar R, Kumar S, Patra A, Jayalakshmi S. Hepatoprotective activity of aerial parts of *Plumbago zeylanica* linn against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharmacy Pharmaceut Sci 2009; 1: 171-5.

Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 2007; 109(2): 177-206.

Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. World J Gastroenterol 2014; 20(48): 18189-98.

Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology, New York

- Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968; 34-75.
- Melo ILP, Silva AMO, Carvalho EBT, Yoshime LT, Mancini DAP, Mancini-Filho J. Effect of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil on Markers of Oxidative Stress Induced by Carbon Tetra-chloride in Wistar Rats. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2015; 5: 1-8.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72(2): 145-71.
- Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054(1): 95-111.
- Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 29(4): 273-300.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-76.
- Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 2002; 50(1): 166-71.
- Osman M, Ahmed M, Mahfouz S, Elaby S. Biochemical studies on the hepatoprotective effects of pomegranate and guava ethanol extracts. *N Y Sci J* 2011; 4: 27-41.
- Parajuli DR, Park EJ, Che XH, Jiang WY, Kim YC, Sohn D, Lee S. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, induces apoptosis of activated hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Molecules* 2013; 18(2): 2122-34.
- Ravikumar S, Gnanadesigan M. Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant *Lumnitzera racemosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1(5): 348-52.
- Recknagel RO, Glende EA JR, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeut* 1989; 43: 139-54.
- Saha SS, Chakraborty A, Ghosh S, Ghosh M. Comparative study of hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of conjugated linolenic acid isomers against induced biochemical perturbations and aberration in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Nutr* 2012; 51: 483-95.
- Sarıca ZS, Liman BC. Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016; 13(2): 109-119.
- Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int* 2010; 43(6): 1614-23.
- Shaban NZ, El-Kersh MA, Bader-Eldin MM, Kato SA, Hamoda AF. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) juice extract on healthy liver and hepatotoxicity induced by diethylnitrosamine and phenobarbital in male rats. *J Med Food* 2014; 17: 339-49.
- Shenoy KA, Somayaji SN, Bairy KL. Hepatoprotective effects of Ginkgo biloba against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 260-6.
- Sumalatha S, Padma D, Pai KSR, Kotian SR, Kumar N, Bhat KM. Hepatoprotective activity of aqueous extract of caesalpinia bonduc against CCl₄ induced chronic hepatotoxicity. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016; 8(4): 207-11.
- Tao LL, Cheng YY, Ding D, Mei S, Xu JW, Yu J, Xu ZD. C/EBP- α ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice through promoting apoptosis of hepatic stellate cells with little apoptotic effect on hepatocytes in vitro and in vivo. *Apoptosis* 2012; 17(5): 492-502.
- Xie J, Liu J, Chen TM, Lan Q, Zhang QY, Liu B, Zhu RZ. Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. *World J Gastroenterol* 2015; 21(18): 5473-81.
- Yang LN, Fu ZX, Li MZ, Hu MY, Zhu MY, Zhou GY, Lin Q. Protective effect of pomegranate seed extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *J Jilin Univ Med Ed* 2011; 5: 21.
- Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragey MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *Life Sci J* 2013; 10: 1534-44.
- Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(11): 3417-21.



Kısa Süreli Saklanan Tavşan Spermasının Spermatolojik Parametreleri Üzerine Taxifolinin Etkileri*

Selcan SEVİM¹, Serpil SARIÖZKAN²

¹Sulusaray İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Tokat-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Serpil SARIÖZKAN; E-mail: serpilsariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5224-2341

Atıf yapmak için: Sevim S, Sariözkan S. Kısa süreli saklanan tavşan spermasının spermatolojik parametreleri üzerine taxifolinin etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 164-172.

Özet: Bu çalışmanın amacı, tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12., ve 24. saat) taxifolinin spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmaktır. Araştırmada sperma vericisi olarak sekiz adet ergin Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Sperma suni vajen yardımıyla haftada üç kez alındı. Tavşanlardan alınan ejakulatlar 37°C'de değerlendirildikten sonra karıştırıldı. Sperma örnekleri dört ayrı gruba ayrıldı. Daha sonra sperma numuneleri Tris (K-Tris), Tris+10 µl taxifolin (10 TT), Tris+100 µl taxifolin (100 TT) ve Tris+500 µl taxifolin (500 TT) ile sulandırıldı. Sulandırılmış sperma numuneleri 4°C'de 24 saat süreyle kısa süreli saklandı. Saklama süresinin ardından bazı spermatolojik parametreler (motilite, akrozom anomali oranı, toplam anormal spermatozoa oranı ve HOST) yönünden analiz edildi. Deneysel çalışmalar 10 kez tekrar edildi. Çalışmanın sonucunda, tüm deneysel gruplarda 24. saat sonunda anormal spermatozoa oranında artış ve plazma membran bütünlüğü ile motilite oranında düşme saptandı. Kontrol grubu verileriyle karşılaştırıldığında 100 TT grubu 6. (%82.50), 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdi (P<0.001). Kısa süreli saklamanın 24. saatinde 100 µl taxifolin ilavesinin diğer gruplara kıyasla akrozomal morfolojik yapının bütünlüğünü istatistiki açıdan önemli derecede koruduğu ve akrozom anomali oranı (%7) ile toplam spermatozoa anomali oranını (%8.50) düşürdüğü ve plazma membran bütünlüğünü de istatistiki olarak önemli derecede koruduğu saptandı (P<0.001). Sonuç olarak, 100 µl taxifolin ilavesinin tavşan spermasının kısa süreli saklanmasında etkin koruyucu bir rol oynadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, kısa süreli saklama, spermatolojik parametreler, tavşan, taxifolin

The Effects of Taxifolin on Spermatological Parameters of Liquid Stored Rabbit Semen

Summary: The aim of this study was to investigate the effect of taxifolin on spermatological parameters of rabbit semen during liquid storage (0, 6, 12, and 24th h). In this study, eight adult New Zealand male rabbits were used as semen donors. Semen was taken with the aid of artificial vagina three times a week. Ejaculates collected from bucks were evaluated and pooled at 37°C. Semen samples were divided into four groups then were diluted with Tris (K-Tris), Tris + 10 µl taxifolin (10 TT), Tris + 100 µl taxifolin (100 TT) and Tris + 500 µl taxifolin (500 TT). The diluted semen samples were liquid stored at 4°C up to 24th h. After the storage period, some spermatological parameters (the percentage of motility, acrosome - total spermatozoa abnormality and HOST) were analyzed. Experimental studies were replicated 10 times. As a result of the study, the percentage of abnormal spermatozoa increased and plasma membrane integrity and motility rate decreased at the end of 24th h in all experimental groups. When compared to the control group data, 100 µl taxifolin addition gave the highest motility rate at 6th (82.50%), 12th (80%) and 24th (77.50%) hour (P <0.001). At the 24th hour of liquid storage, 100 µl taxifolin addition was found to protect statistically significantly the integrity of acrosomal structure and plasma membrane compared to other groups. In addition, it was determined that the percentage of acrosome (7%) and total spermatozoa abnormality (8.50%) was low in the 100 TT group when compared to other groups (P <0.001). In conclusion, it was found that addition of 100 µl taxifolin plays effective protective role on short-term storage of rabbit semen.

Key words: Antioxidant, liquid storage, rabbit, spermatological parameters, taxifolin

Giriş

Tavşanlar biyoteknolojik araştırmalarda yaygın şekilde kullanılan bir laboratuvar hayvanı modelidir. Fareler ve ratlar gibi diğer laboratuvar hayvanlarında ötanazi sonrası epididimal sperma-

nın alınmasının aksine tavşanlar, suni vajene uyum sağlarlar ve ötanazi edilmeksizin sperma almaya elverişlidir. Bu sayede tavşanlar spermatozoa çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Hafez, 1970). Soğutulmuş ya da dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın canlılık ve kalite değerleri, saklama periyodu süresince şekillenen soğuk hasarından olumsuz etkilenmektedir. Bu olumsuz durum spermanın suni tohumlamadaki başarısını düşürebilmektedir. Soğutulmuş

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.02.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 05.05.2020

* Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-8224 numaralı proje kapsamında desteklenmiş ve aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

ya da dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile elde edilen fertilitite oranları, taze spermanınki ile karşılaştırıldığında oldukça düşük bulunmaktadır. Bu durum araştırmacıları halen en uygun saklama koşullarını (uygun ısı, süre, sperma sulandırıcısı, antioksidan ve membran stabilizatör katkı maddeleri vs.) araştırmaya yöneltmiştir. Son yıllarda özellikle sperma sulandırıcılarına antioksidan ilavesi ve olumlu etkileri ile ilgili çalışma yapılmaktadır (Avdatek ve ark., 2018). Spermanın soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi sırasında oluşan soğuk şoku; spermatozoa motilitesi, canlılığı, deoksiribonükleik asit (DNA) ve membran bütünlüğü ve fertilizasyon yeteneği üzerinde geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirmektedir. Soğutma veya dondurma/çözdürme sonrası şekillenen lipid peroksidasyon, anormal spermatozoaya yol açmaktadır. Bu olaydaki ana neden spermatozoon membranlarının doymamış yağ asidince zengin olması, yüksek oksijen yoğunluğunun etkisiyle oksidatif stres ve peroksidatif atıkların şekillenmesi ve sonuçta da serbest oksijen radikalleri (ROS) açığa çıkarak spermatozoanın ölümüne yol açmasıdır (Garrido ve ark., 2004). Spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında meydana gelen ROS, düşük yoğunlukta; hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermatolojik fonksiyonların meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Ancak, yüksek yoğunlukta ROS, spermatolojik fonksiyonları olumsuz etkileyerek infertiliteye neden olabilmektedir (Aitken ve Baker, 2004). Fizyolojik olarak spermada ROS ürünlerinin oluşumu ve detoksifikasyonu arasında denge bulunmaktadır. Gerek seminal plazmada gerekse spermatozoada ROS ürünlerinin detoksifikasyonunda görevli glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan sistemleri mevcuttur. Ancak, bu doğal savunma mekanizması spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi işlemleri sırasında zarar görmekte ve ROS ürünleri spermatozoada geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirmektedir (Bilodeau ve ark., 2000). Spermanın soğutulması ile dondurulması-çözdürülmesi işlemleri esnasında oluşan membran-lipit faz değişimi, osmotik-mekanik stres ve ROS, spermatozoa membran proteinlerinde denaturasyona, hücre organellerinde yapısal deformasyona, DNA'da kırılmalara ve hücrelize yol açmaktadır (Saleh ve Agarwal, 2002). Bu olumsuz durumun sperma sulandırıcılarına

değişik antioksidanların ilavesiyle azaltılabildiği ve çözüm sonu spermatozoa parametrelerini iyileştirdiği bildirilmektedir (Sarıözkan ve ark., 2009). Taxifolin (3,5,7,3,4-pentahydroxy flavanone veya dihydroquercetin), flavonoidlerin alt sınıfı olan flavanones grubundandır ve güçlü bir flavonoiddir. Turunçgiller ve soğan bol miktarda taxifolin içermektedir (Rice-Evans ve ark., 1996). Taxifolinin güçlü bir antioksidan ve anti-radikal aktiviteye sahip olduğu, ayrıca gıda ve farmasötik ürünlerdeki lipid peroksidasyonunun en aza indirgenmesi veya önlenmesi, zehirli oksidasyon ürünlerinin oluşmasının geciktirilmesi, beslenme kalitesinin korunması ve raf ömrünün uzatılması gibi alanlarda kullanılabilceği de bildirilmiştir (Topal ve ark., 2016). Gupta ve ark. (1971), yaptıkları bir çalışmada, taxifolinin albino sıçanlarda inflamasyonun eksudatif ve proliferatif fazları üzerinde kuvvetli antienflamatuar etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2019), çeşitli organlarda ve özellikle kardiyovasküler sistemde toksiteye yol açan yapay bir kirletici olan di-2-ethylhexyl phtalatenin tavuklarda kardiyomiyositler üzerinde oluşturduğu toksik etkiyi taxifolinin antagonize ederek azalttığını rapor etmişlerdir. Yapılan diğer çalışmada, taxifolinin serum lipid düzeyini dengeleyip normal seviyelere getirmesi suretiyle antienflamatuar etkisi, kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkisi ve ROS'un uyardığı oksidatif strese bağlı şekillenen kanser vakalarında güçlü antioksidan etkileri rapor edilmiştir (Kuang ve ark., 2017).

Yapılan literatür taramalarında antioksidan etkinliği pek çok farklı çalışmada kanıtlanmış olan taxifolin maddesinin sperma sulandırıcılarına eklenmesine ve spermanın saklanması sürecinde olası olumlu antioksidatif etkinliğine yönelik bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle mevcut çalışmamızda sperma sulandırıcısına antioksidan olarak taxifolini ekleyerek tavşan spermasının +4 °C'de saklanması süresince etkilerini incelemek, tavşan spermasının kısa süreli saklanması en uygun sperma sulandırıcısı geliştirebilmek, taxifolinin beklenen olası koruyucu etkileri sebebiyle diğer türlerde spermanın saklanabilirliği üzerine bir model oluşturabilmek ve sonraki çalışmalar için literatüre katkı sağlayabilmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali

Bu çalışmaya Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (EÜHADYEK, 13.12.2017 tarih ve 17/132 sayı) onay verildi. Çalışmada sperma donörü olarak ergin sekiz adet Yeni Zelanda ırkı erkek tavşan kullanıldı. Çalışma, erkek tavşanlardan suni vajen tekniği ile alınan spermalarda yürütüldü. Ergin erkek tavşanlar bireysel kafeslerinde Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) uygulanan rutin bakım-besleme koşulları olan 12 saat aydınlık/12 saat karanlık, 22-24°C oda ısısı ve % 55-60 nisbi nem oranına sahip ortamda barındırıldı. Ticari tavşan yemi (Optima Yem, Bolu-Türkiye) ve taze içme suyu ile *ad libitum* besleme yapıldı.

Spermanın alınması

Çalışmada kullanılacak ergin erkek tavşanlardan haftada üç kez suni vajen yardımıyla sperma alındı. Alınan spermaların mikroskopik kontrolleri yapıldıktan sonra bireysel farklılıkları elimine edebilmek amacıyla kitle hareketi 3 ve üstü (0-5 skala), motilitesi %70 ve üstü, yoğunluğu 300×10^6 spermatozoa/ml özelliklerine sahip olan ejakulatlar birleştirildi. Bu çalışmada 10 adet miks edilmiş ejakulat kullanıldı. Her bir miks edilmiş ejakulat deneme gruplarına ayrıldı.

Spermanın sulandırılması ve deneysel grupların oluşturulması

Çalışmada spermanın sulandırılması amacıyla Tris sulandırıcısı (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) kullanıldı. Her bir grup 30×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde sırasıyla kontrol, 10 µl, 100 µl ve 500 µl dozda taxifolin (Sigma T4512) içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. Spermanın sulandırılmasını takiben Kontrol (Tris sulandırıcısı) (T), 10 µl Taxifolin+ Tris (10TT), 100 µl Taxifolin+Tris (100TT), 500 µl Taxifolin+Tris (500TT) grupları oluşturuldu. Sulandırılmış sperma örnekleri +4 °C' de buzdolabına bırakılmıştır. Ardından 0., 6., 12. ve 24. saatlerin sonunda spermatolojik analizlerden; spermatozoa motilite oranı, akrozomal ve toplam anomali oranı ve plazma membran bütünlüğü analiz edildi.

Spermatolojik analizler

Spermatozoa motilite oranı: Spermatozoa motilite oranı, lam üzerine alınan 10 µl sperma üzerine lamel kapatılarak 37 °C ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 400'lük büyütmede subjektif yolla tespit edilmiştir. Beş farklı mikroskop sahasında motilite oranı (%) değerlendirildi. Alınan tüm değerlerin ortalaması o numunenin motilite oranı olarak kabul edildi (Roca ve ark., 2000).

Anormal spermatozoa oranı: Spermatozoa akrozom ve toplam anomali oranı tespiti amacıyla her bir numuneden alınan 3 damla sperma 1 ml Hancock solüsyonu içine eklendi. Karışımdan alınan 1 damla lam üzerine alınıp üstüne lamel kapatılarak faz-kontrast mikroskopta 1000'lik büyütmede toplam 200 hücre sayılarak test edildi (Schafer ve Holzman, 2000).

Hypo-osmotic swelling test (HOST) oranı: Spermatozoa plazma membran bütünlüğünün test edilmesi amacıyla Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) kullanıldı. 300 µl HOST solüsyonu ile 30 µl sperma karıştırılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından karışımdan 0.2 µl lam üzerine alınarak faz-kontrast mikroskopta 400' lük büyütmede değerlendirildi. En az beş değişik mikroskop sahasında toplam 200 hücre sayılarak şişmiş ve kıvrık kuyruklu spermatozoonların tespiti yapıldı (Revell ve Mrode, 1994).

İstatistiksel analizler

Deneysel çalışmalar 10 kez tekrar edildi. Kontrol, 10 TT, 100 TT ve 500 TT deney grupları arasındaki farklılıkların önem kontrolü Kruskal Wallis ile yapıldı. Her bir deney grubuna ait 0., 6., 12., ve 24., saatleri arasındaki motilite, akrozom- total anomali ve HOST değişkenleri bakımından farklılıkların istatistiksel olarak önem kontrolleri Friedman testi ile yapıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Benferroni düzeltmesi yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri medyan değer, 1. (%25) ve 3. (%75) çeyrekler ile gösterildi. İstatistiki analizler NCSS 9 programı ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi $P < 0.05$ olarak belirlendi.

Bulgular

Kısa süreli saklanan tavşan spermasının motilite ve akrozom anomali oranları üzerine taxifolinin etkileri Tablo 1'de plazma membran bütünlüğü ve spermatozoa toplam anomali oranları

üzerine etkileri Tablo 2. de gösterildi. Buna göre; saklama periyodunun ilerleyen saatlere göre deney gruplarının motilite oranları değerlendirildiğinde; K, 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları dâhil tüm deney gruplarında saklama periyodunun 0. saatinden 24. saatine doğru ilerlemesiyle beraber motilite oranlarında düşmeler gözlemlendi. İstatistiki önem yönünden incelendiğinde ve 0. saat verileriyle karşılaştırıldığında kontrol ve 500 TT grubunda motilite oranındaki bu düşme saklama süresinin 12. saatinde ($P<0.001$); 10 TT ve 100 TT deney grubunda ise 24. saatinde sırasıyla $P<0.01$, $P<0.05$ düzeyinde saptandı. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında ise kısa süreli saklama periyodunun 0. saatinde K, 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P>0.05$). Buna göre; kontrol grubu verileriyle karşılaştırıldığında deney grupları arasında

100TT grubu 6., (%82.50) 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdi ($P<0.001$).

Akrozom anomalisi oranları değerlendirildiğinde; deney gruplarının 4°C ' de kısa süreli saklama periyodunun 0. saatinden 24. saatine doğru ilerlemesiyle beraber tüm gruplarda akrozom bütünlüğünde istatistiki açıdan önemli oranlarda bozulmalar gözlemlendi. Kontrol grubu ile Taxifolinin farklı dozlarında katıldığı deney gruplarının akrozom anomalisi oranları, saklama süresinin 0. saat verileri ile kıyaslandığında tüm deney gruplarında 12. saatten itibaren akrozom anomalisinde istatistiki açıdan önemli oranda artışların olduğu saptandı ($P<0.001$). Saklamanın son 24. saati bulguları değerlendirildiğinde ise 100 TT grubunun diğer tüm deneme gruplarına kıyasla akrozom bütünlüğünü istatistiki açıdan

Tablo 1. Tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12. ve 24. saatler) farklı taxifolin dozlarının motilite ve akrozom anomalisi oranları üzerine etkileri

Değişken	Grup	Saat [Medyan (%25-%75)]				P değeri (Friedman Testi)
		0. Saat	6. Saat	12. Saat	24. Saat	
Motilite oranı (%)	Kontrol	85.00 (81.25-88.75) ^a	70.00 (70.00-75.00) ^{abBC}	65.00 (60.00-65.00) ^{bcBC}	55.00 (50.00-55.00) ^{cBC}	<0.001
	10TT	85.00 (77.50-88.75) ^a	80.00 (76.25-85.00) ^{aAB}	75.00 (75.00-80.00) ^{abAB}	70.00 (66.25-70.00) ^{bAB}	<0.01
	100TT	85.00 (80.00-90.00) ^a	82.50 (80.00-85.00) ^{aA}	80.00 (80.00-80.00) ^{abA}	77.50 (75.00-80.00) ^{bA}	<0.05
	500TT	85.00 (76.25-88.75) ^a	60.00 (60.00-65.00) ^{abC}	55.00 (51.25-60.00) ^{bcC}	50.00 (50.00-50.00) ^{cC}	<0.001
	P değeri (Kruskal Wallis testi)		>0.05	<0.001	<0.001	<0.001
Akrozom anomalisi oranı (%)	Kontrol	3.00 (3.00-3.75) ^a	6.00 (5.25-6.75) ^{abAB}	10.00 (9.25-11.75) ^{bcA}	14.50 (13.25-15.00) ^{cA}	<0.001
	10TT	3.00 (3.00-3.75) ^a	5.00 (5.00-6.00) ^{abB}	7.00 (6.25-8.00) ^{bcBC}	9.00 (9.00-10.00) ^{cAB}	<0.001
	100TT	3.00 (3.00-3.75) ^a	5.00 (4.25-5.75) ^{abB}	6.00 (5.00-7.00) ^{bc}	7.00 (6.25-8.00) ^{bB}	<0.001
	500TT	3.50 (3.00-4.75) ^a	6.50 (5.25-7.00) ^{abA}	10.00 (7.50-10.75) ^{bcAB}	14.50 (10.75-15.75) ^{cA}	<0.001
P değeri (Kruskal Wallis testi)		>0.05	<0.05	<0.001	<0.001	

A, B, C : Aynı sütunda (gruplar arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

a, b, c : Aynı satırda (saatler arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

Tablo 2. Tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12. ve 24. saatler) farklı taxifolin dozlarının plazma membran bütünlüğü (HOST) ve spermatozoa toplam anomali oranları üzerine etkileri

Değişken	Saat [Medyan (%25-%75)]				P değeri (Friedman Testi)		
	12. Saat	24. Saat	0. Saat	6. Saat			
Plazma membran bütünlüğü oranı (%)	Grup	Kontrol	70.00 (65.50-71.00) ^a	57.50 (54.25-59.50) ^{abBC}	50.00 (46.00-52.50) ^{bcBC}	44.00 (41.25-48.75) ^{cB}	<0.001
		10TT	68.50 (66.00-71.00) ^a	65.00 (63.00-66.75) ^{abA}	62.50 (56.75-63.75) ^{baA}	53.00 (49.50-55.00) ^{bcAB}	<0.001
		100TT	69.50 (66.50-73.00)	67.00 (65.25-69.75) ^A	66.00 (64.00-68.00) ^A	65.00 (61.50-67.50) ^A	>0.05
		500TT	68.00 (66.25-69.75) ^a	62.50 (59.50-64.50) ^{abAB}	60.50 (58.50-61.75) ^{abAB}	51.50 (48.25-58.50) ^{bB}	<0.001
		P değeri (Kruskal Wallis testi)	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	
Spermatozoa toplam anomali oranı (%)	Grup	Kontrol	7.00 (6.00-8.00) ^a	11.50 (10.00-12.75) ^{abA}	13.50 (12.25-14.75) ^{bcA}	18.50 (16.25-20.75) ^{cA}	<0.001
		10TT	7.00 (6.00-8.00) ^a	7.00 (6.25-8.00) ^{ab}	9.00 (8.25-10.00) ^{abB}	12.00 (9.25-13.00) ^{bBC}	<0.001
		100TT	6.50 (6.00-7.75) ^a	8.00 (6.25-8.00) ^{abB}	7.50 (7.00-9.00) ^{abB}	8.50 (8.00-10.00) ^{bc}	<0.01
		500TT	7.00 (6.00-7.75) ^a	8.00 (7.00-9.00) ^{abB}	10.00 (9.00-11.00) ^{bcB}	14.50 (14.00-16.75) ^{cAB}	<0.001
		P değeri (Kruskal Wallis testi)	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	

^{A, B, C} : Aynı sütunda (gruplar arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

^{a, b, c} : Aynı satırda (saatler arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

daha iyi koruduğu saptandı (P<0.001). Gruplar arası istatistiki değerlendirilmelerde; 0. saatlerde akrozom anomalisi yönünden istatistiki bir farklılık bulunmadı (P>0.05). Kısa süreli saklamanın 24. saatine gelindiğinde 100 TT grubunun (%7) kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan önemli derecede akrozomal morfolojik yapının bütünlüğünü koruduğu ve akrozom anomalisi oranının düşük olduğu saptandı (P<0.001).

Spermatozoa plazma membran bütünlüğünün test edildiği HOS test verileri değerlendirildiğinde; kısa süreli saklama periyodunun 24. saate doğru ilerlemesiyle beraber plazma membran bütünlüğünün korunmasında istatistiki farklılıklar 0. saat verileriyle karşılaştırıldığında spermatozoa plazma membran bütünlüğü oranının kontrol ve 10 TT gruplarında 12. saatten itibaren başladığı tespit edildi (P<0.001). Deney gruplarından 100 TT verileri incelendiğinde 0., 6., 12.,

ve 24. saatleri arasında plazma membran bütünlüğü oranında düşüş tespit edilmiş olsa da bu durum istatistiki olarak önemli bulunmadı (P>0.05). Taxifolinin 500 µl dozunda katıldığı 500 TT grubunda ise 0. saat verisiyle karşılaştırıldığında spermatozoa plazma membran bütünlüğündeki bozulmaların 24. saatte istatistiki olarak önemli bulunduğu belirlendi (P<0.001). Kontrol grubu ile taxifolinin farklı dozlarının kullanıldığı 10TT, 100TT ve 500TT deney gruplarına ait spermatozoa plazma membran bütünlüğü oranları arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde; 0. saatte deney grupları arasında istatistiki bir fark olmadığı saptandı (P>0.05). Kısa süreli saklama periyodunun 6. ve 12. saatinde 10 TT ve 100 TT gruplarının istatistiki olarak benzer HOST değerine sahip olduğu saptandı. Kontrol ve 500 TT deney gruplarına ait verilerle kıyaslandığında; belirtilen gruplara ait bu HOST

değerlerinin, istatistiki açıdan daha yüksek olduğu saptandı ($P<0.001$). Tavşan spermasının kısa süreli saklama periyodunun 24. saatinde 100 TT grubunda diğer tüm bütünlüğünün korunduğu tespit edildi ($P<0.001$).

Kontrol grubu dahil tüm deney gruplarında spermanın kısa süreli saklanması süresince ilerleyen zamanla beraber toplam spermatozoa anomali oranında istatistiki açıdan önemli oranlarda artış gözlemlendi. Tavşan spermatozoasında toplam anomali oranı kısa süreli saklama süresinin 0. saat ile 24. saat arası sürede analiz edildiğinde ve 0. saat verileriyle kıyaslandığında; K ($P<0.001$) ve 500 TT grubunda ($P<0.001$) 12. saatten; 10 TT ($P<0.001$) ve 100 TT ($P<0.01$) gruplarına ait toplam anomali oranlarının ise 24. saatten itibaren artış gösterdiği saptandı. Deney grupları arasındaki farklılıklar analiz edildiğinde; saklama süresinin 0. saatinde gruplar arasında toplam spermatozoa oranında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı ($P>0.05$) saptandı. Saklama periyodunun 6. ve 12. saat verileri incelendiğinde ve kontrol grubu verileriyle kıyaslandığında 10 TT, 100 TT ve 500 TT gruplarında spermatozoanın normal morfolojik yapısının daha iyi korunduğu belirlendi ($P<0.001$). Kısa süreli saklama periyodunun 24. saat verileri incelendiğinde kontrol grubu verisiyle karşılaştırıldığında 10 TT ve 100 TT grubunda spermatozoa toplam morfolojik yapısının daha iyi korunduğu ve 100 TT grubunun istatistiki olarak daha düşük toplam spermatozoa anomali oranı verildiği saptandı ($P<0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın saklanması teknikleri; spermanın sıvı halde kısa süreli saklanması ya da dondurularak uzun süreli saklanması kapsamaktadır (Tittarelli ve ark., 2006). Ancak, her iki sperma saklama tekniğinde de spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi gibi uygulanan pek çok işlem spermatozoa motilitesinde azalma, membran bütünlüğünde bozulma ile DNA hasarlı spermatozoa sayısında artış ve sonuçta fertilitede düşüş gibi geri dönüşümsüz hasarlar oluşturmaktadır (De Lamirande ve ark., 1997; Holt, 2000). Spermada oluşan bu hasarların ROS'un aşırı üretilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir. ROS'un membran lipidlerini oksitlemesiyle lipid peroksidasyon oluşmaktadır. Normalde spermatozoa ve seminal plazmada şekillenen lipid peroksidasyonu

dengeleyebilmek ve ROS'un kontrolsüz üretimini engelleyebilmek amacıyla kimi antioksidanlar ve antioksidatif savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Ancak, saklanma süresince spermatozoada sitoplazmanın az olmasına bağlı olarak bu savunma sistemi yeterli olamamaktadır (Agarwal ve ark., 2005). Dolayısıyla, sperma sulandırıcılarına çeşitli antioksidanlar ilave edilerek spermanın saklanması yönelik pek çok çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2019; Sabir ve ark., 2019).

Çalışmamızda, tavşan spermasının kısa süreli saklanması ilerleyen saklama periyodu süresince spermatozoa motilite oranı, morfolojik yapısı ve plazma membran bütünlüğü gibi önemli kimi spermatolojik parametrelerdeki değişimleri ve bu değişimler üzerine taxifolinin doza bağlı etkileri gösterildi. Yapılan çalışmada kontrol, taxifolinin farklı dozlarında kullanıldığı 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları dâhil tüm deney gruplarında tavşan spermasının 4°C'de kısa süreli saklanması sırasında saklama süresinin 0. saatten 24. saate doğru ilerlemesiyle beraber istatistiki açıdan önemli motilite oranlarında düşmeler, akrozom ve plazma membran bütünlüğü ile toplam morfolojik yapıda bozulmalar gözlemlendi. Bu durum, spermatozoa mitokondri yapılarının bozulmasıyla beraber enerji üretiminde sorunların oluşmasına bağlanabilmektedir. Spermatozoa motilitesi için gereken enerji çok sayıda bulunan mitokondriyalarda sağlanmaktadır. Spermatozoanın fonksiyon bozukluklarında serbest oksijen düzeyi oldukça artmaktadır ki bu durum mitokondriaların da çalışmasını bozarak motilite gibi pek çok spermatozoa fonksiyonlarını geri dönüşümsüz hasara uğratmaktadır (Agarwal ve ark., 2014).

Çalışmada deney grupları arasında 100 TT grubunun 6., (%82.50), 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdiği ve daha etkin koruma sağladığı saptanmıştır. Bu durum, spermanın soğutulmasıyla birlikte metabolizmasının yavaşlamasına aynı zamanda sperma sulandırıcısına eklenen taxifolinin doza bağlı olarak güçlü antioksidatif etki göstermesine bağlanabilmektedir. Saklama periyodunun 24. saatinde 100 TT grubundaki motilite oranı (%77.50) Sarıözkan ve ark. (2013) ve (2014)'nın farklı antioksidan maddeler katarak yaptıkları tavşan spermasının kısa süreli saklanması çalışmalarının 24. saat verilerine benzerlik göstermektedir. Belirtilen çalışmalarda

antioksidan etkinliğe sahip maddeler sperma sulandırıcılarına katılmış ve antioksidan katkı maddelerinin etkisiyle ilgili gruplarda tavşan spermasının kısa süreli saklanması sonrasında motilite oranlarının ilerleyen zamana karşı daha iyi korunduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızın 10 TT ve 100 TT gruplarında tavşan spermasının 24 saatlik kısa süreli saklama periyodu sonunda motilitede yüksek oranların elde edilmesi taxifolinin özellikle spermanın soğutulması sürecinde şekillenen soğuk şokunun uyardığı ROS'u önleyebilmesine bağlanabilmektedir. Taxifolin, flavanone grubu içinde yer alan güçlü antioksidan etkili bir maddedir (Rice-Evans ve ark., 1996). Flavonoidler, antioksidan etkilerini metal iyonlarını bağlayarak ve serbest radikallerin oluşmasına neden olan enzimatik reaksiyonları inhibe ederek göstermektedir (Cotelle, 2001). Yapılan çalışmalarda bir çeşit flavanoid olan taxifolinin antioksidatif etkinliği, redüksiyon, ROS'u temizleme yeteneği ve metal şelatlama aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Topal ve ark., 2016). Dolayısıyla, çalışmamızın sonucu, taxifolinin soğuk şokunun etkisiyle aşırı üretilen ROS'un oluşturduğu oksidatif strese karşı antioksidan kimliğiyle savunma sergilediği ve metal iyonlarını bağlamak suretiyle lipidlerin oksidasyonunu engelleyebildiği ve serbest radikallerin oluşmasında görevli enzim sistemlerini inhibe edebildiği bilgisiyyle paralellik göstermektedir (Sunil ve Xu, 2019).

Gruplar arası değerlendirmede saklama süresinin 24. saatinde 10 TT ve 100 TT grubunda akrozomal yapı bütünlüğü ve spermatozoa toplam morfolojik yapısının daha iyi korunduğu ve 100 TT grubunun istatistiki olarak daha düşük akrozomal ve spermatozoa toplam anomali oranı verdiği saptanmıştır.

Diğer evcil hayvanların aksine tavşan seminal plazması yüksek kolesterol/fosfolipid oranı ve düşük doymamış/doymuş yağ asidi oranına sahiptir. Bu durum membran yapısına orta düzeyde akışkanlık kazandırırken çevresel strese karşı daha güçlü dayanıklılık sağlamaktadır (Castellini ve ark., 2006). Her ne kadar tavşan spermatozoasının membran yapısı lipid bileşeni soğuk şokuna karşı direnç sağlasa da yapılan pek çok çalışmada spermanın soğutulması sırasında ilerleyen zamanla birlikte tavşan spermatozoonu morfolojik yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaların olduğu bildirilmiştir (Rosato

ve laffaldano, 2011). Çalışmamızın sonucu, kısa süreli saklamanın 24. saatinde spermatozoonun akrozom, baş ve kuyruk morfolojik yapısında hasarların olması yönüyle yukarıda belirtilen literatürlerde verilen bilgilerle benzerlik göstermektedir.

Tavşan spermasının kısa süreli saklama periyodunun 24. saat verileri değerlendirildiğinde 100 TT grubunda plazma membran bütünlüğünün diğer tüm deney gruplarından istatistiki olarak önemli derecede daha iyi plazma membran bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. Spermatozoada membran hasarları, spermanın soğutulması işlemi sırasında sıcaklığın 20°C'den 5°C'ye hızlı şekilde düşmesiyle birlikte şekillenen soğuk şoku esnasında spermatozoanın yaşlanması sonucu oluşmaktadır (Paulenz ve ark., 2002). Hücre membranının soğuk şokundan ilk etkilenen bölge olduğu ve bu yapıda gözlenen yapısal değişimlerin; protrüzyonlar, dalgalanmalar ve vezikülasyonlardan membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır hasarlara kadar vardığı bildirilmektedir (Morris ve ark., 1999). Dolayısıyla yaptığımız çalışmada; tavşan spermasının 4°C'de saklama süresinin ilerlemesiyle beraber spermatozoa membran bütünlüğünde tespit ettiğimiz bozulmalar yukarıda bildirilen literatürlere paralel şekillenmiştir.

Tavşan spermasının kısa süreli saklamanın yapıldığı bir çalışmada kullanılan antioksidan maddenin saklama periyodunun 12. saatinde motilite, akrozomun morfolojik yapısı ve membran bütünlüğünde istatistiki açıdan önemli düzeyde koruma sağladığı rapor edilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2014). Koçlarda kısa süreli saklamanın yapıldığı bir başka çalışmada da kullanılan antioksidan maddelerin spermatozoa motilitesi, plazma membran bütünlüğü ve normal morfolojik yapının korunmasında istatistiki açıdan önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bucak ve ark., 2007). Yaptığımız çalışmada saklama periyodunda zaman ilerledikçe spermatozolojik parametrelerde 0. saat verilerine kıyasla bozulmaların başladığı tespit edilmiştir. Bu durum, soğutma, dondurma-çözdürme işlemleri spermatozoonun morfolojik yapı ve fonksiyonlarına zarar verebildiği bilgisine benzerlik göstermektedir (Kim ve ark., 2011). Ayrıca, 100 TT grubunda kullanılan taxifolin dozunun kısa süreli saklamanın 24. saatinde spermatozoa motilitesini, normal morfolojik yapısını ve plazma memb-

ran bütünlüğünü etkin bir şekilde koruduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma, taxifolin katılmamış kontrol grubu ile taxifolinin 3 farklı dozu kullanılarak 4 °C de kısa süreli saklama yapılmış tavşan spermatozoasında 24 saatlik değişimi gösteren model bir çalışmadır. Çalışma sonucunda 100 µl dozda kullanılan taxifolinin; kontrol grubuna kıyasla motilite oranında 6., 12. ve 24. saatlerde istatistiki olarak en yüksek oranı verdiği, kısa süreli saklamanın 12. ve 24. saatte plazma membran bütünlüğünü istatistiki olarak önemli derecede koruduğu ve istatistiki olarak daha düşük spermatozoa toplam anomali oranı verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla taxifolinin dozu arttıkça toksik etki gösterebileceği, düşük dozda kullanıldığında ise koruyucu etki göstermediği kanısına varılmıştır. Dolayısıyla, antioksidatif etkinliği bilinen taxifolinin sperma sulandırıcısına ilave edilmesiyle tavşan spermasının spermatojistik karakterlerinde doza bağlı olarak koruma sağladığı söylenebilmektedir. Taxifolinin farklı dozları ve farklı saklama süreleriyle gerek tavşanlarda ve gerekse diğer türlerde spermanın saklanabilirliği üzerine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla daha fazla araştırmaların yapılması önerilmektedir.

Kaynaklar

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Bio Med Online* 2014; 29(1): 32-58.
- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26(6): 654-60.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fert Dev* 2004; 16(5): 581-8.
- Avdatek F, Yeni D, Gündoğan M. Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatojistik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet J* 2018; 11(2): 126-33.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000;

55(3): 282-8.

- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R. Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2007; 47(2): 15-21.
- Castellini C, Cardinali R, Dal Bosco A, Minelli A, Camici O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 2006; 65(4): 703-12.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(6): 569-90.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2(1): 48-54.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Prooxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004; 6(1): 59-66.
- Gupta MB, Bhalla TN, Gupta CR, Mitra GP, Bhargava KP. Anti-inflammatory activity of taxifolin. *Japan J Pharmacol* 1971; 21(3): 377-82.
- Hafez ESE. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1970; pp. 273-98.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62(1-3): 3-22.
- Kim S, Lee YJ, Kim YJ. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2011; 124(1-2): 118-24.
- Kuang H, Tang Z, Zhang C, Wang Z, Li W, Yang C, Wang Q, Yang B, Kong AN. Taxifolin activates the Nrf2 anti-oxidative stress pathway in mouse skin epidermal JB6 P+cells through epigenetic modifications. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7): 1546.
- Morris GJ, Acton E, Avery S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 1999; 14(4): 1013-21.
- Paulenz H, Söderquist L, Perez-Pe R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 2002; 57(2): 823-36.

- Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, 1994; 36: 77-86.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996; 20(7): 933-56.
- Roca J, Martinez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2000; 64(1-2): 103-12.
- Rosato MP, Iaffaldano N. Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a Tris-based or a jellified extender. *Reprod Domest Anim* 2011; 46(2): 301-8.
- Sabir SA, El-Gindy YM, Morshedy SA, Zahran SM, Ahmed MH, Zeweil HS. Semen quality, sex hormone and antioxidant status of male rabbits as influenced by two forms of onion. *Egypt Poult Sci* 2019; (31-39): 31-8.
- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J Androl* 2002; 23(6): 737-52.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş Alkım P, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 2009; 58(2): 134-8.
- Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 2014; 68(3): 349-53.
- Sarıözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A, Eken A, Akçay A. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 2013; 67(1): 1-6.
- Schafer S, Holzman A. The use of transmigration and sperm stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2000; 59(3-4): 201-11.
- Sunil C, Xu B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* 2019; 166: 112066.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De La Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 2006; 66(6-7): 1637-40.
- Topal F, Nar M, Gocer H, Kalin P, Kocyigit UM, Gülçin İ, Alwaseel SH. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016; 31(4): 674-83.
- Zhang HQ, Wang YJ, Yang GT, Gao QL, Tang MX. Taxifolin inhibits receptor activator of NF-kappaB ligand-induced osteoclastogenesis of human bone marrow-derived macrophages in vitro and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss in vivo. *Pharmacology* 2019; 103(1-2): 101-9.
- Zhu Z, Li R, Lv Y, Zeng W. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* 2019; 88: 1-8.



Analytical Methods for Determination of Aflatoxin B₁ in Animal Feeds and Feedstuffs*

Saima MUSHTAQ¹, Yavuz Kürşad DAŞ¹, Abdurrahman AKSOY¹

¹Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Samsun-TURKEY

Corresponding author: Yavuz Kürşad DAŞ; E-mail: ykdas@omu.edu.tr; ORCID: 0000-0001-8634-5752

How to cite: Mushtaq S, Daş YK, Aksoy A. Analytical methods for determination of aflatoxin B₁ in animal feeds and feedstuffs. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 173-179.

Summary: Aflatoxin B₁ (AFB₁) is an *Aspergillus spp.* produced mycotoxins which is identified as one of the key contaminant of feeds and toxic to some degree to all species tested to date. Because of its hepatocarcinogenic nature, AFB₁ has obtained significant attention in past few years. A number of analytical, diagnostic and immunological procedures are available for assessment and estimation of AFB₁ in different feeds such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and electrochemical immunosensors (ECI). All available analytical methods for determination of AFB₁ principally included the same steps like, sampling, sample preparation, detection, confirmation, and finally risk assessment. HPLC approaches are most commonly used nowadays because of their high accuracy, precision and sensitivity. Since late 20th century, many countries including Turkey has imposed strict rules and regulations regarding AFB₁ in food and animal feed related industry to protect the consumer from the detrimental effects of the toxin. In this article, a number of analytical techniques for determination of AFB₁ in feeds and feedstuffs starting from sampling to risk assessment and international regulations are reviewed.

Key words: Aflatoxin B₁, analytical methods, international regulations, risk assessment, sampling

Hayvan Yem ve Yem Hammaddelerinde Aflatoxin B₁'in Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri

Özet: Aflatoxin B₁ (AFB₁) yemlerde ana kirlenici olan *Aspergillus* türleri tarafından üretilen ve bütün türlerde belirli dozelerde zehirli olan bir mikotoksindir. Karaciğer kansinogeni olduğundan, son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. AFB₁'in çeşitli yemlerden analizinde enzim bağımlı immünosorbent assay (ELISA), ince tabaka kromatografisi (ITK), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ve elektrokimyasal immünosensör (EKI) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Belirtilen yöntemlerin hepsinde örnek alma ve hazırlama, tespit, doğrulama ve risk değerlendirme aşamaları bulunur. HPLC yüksek doğruluk, kesinlik ve hassasiyetinden dolayı en yaygın kullanılan analiz yöntemidir. Türkiye dahil birçok ülke, 20. yy. sonundan beri, tüketiciyi zararlı etkilerinden korumak için gıda ve yem ile ilgili sektörlerde AFB₁ için katı kural ve düzenlemeler yürürlüğe koymuştur. Bu makalede, yem ve yem hammaddelerinde, örneklemeden risk değerlendirme aşamasına kadar, AFB₁ analizinde kullanılan çeşitli yöntemler ve uluslararası düzenlemeler derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aflatoxin B₁, analiz yöntemleri, örnekleme, risk değerlendirmesi, uluslararası düzenlemeler

Introduction

Aflatoxins (AFs) are organic chemicals and derived metabolites of different strains of fungi, like *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. These toxins are mutagenic, teratogenic, carcinogenic, and immunosuppressive in their nature and usually found as contaminants in a variety of crops like cereals, oilseeds, tree nuts and spices (Marchese et al., 2018).

Animals are exposed to AFB₁ toxicity after consuming the contaminated feeds and feedstuffs. Liver metabolised the AFB₁ and AFB₂ by cytochrome p450 enzyme and excrete it as AFM₁ and AFM₂, such metabolites are reported in various milk and milk products (Aksoy et al., 2009a; Aksoy et al., 2010). In order to prevent the toxicity of AFs some absorbents like hy-

drated sodium calcium and aluminosilicate are mixed in feed which prevent the absorption of AFs by binding with it in gastrointestinal tract (Essiz et al., 2006).

Commercially and for research purposes AFs are being detected by various techniques like enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), thin layer chromatography (TLC). The more precise, sensitive and advance technique is high performance liquid chromatography (HPLC) (Manetta, 2011). A number of analytical techniques to analyze AFB₁ in feed or feedstuffs are being reviewed in this study, starting from sampling, procedure/technique and relevant pros and cons coined with those analytical methods. Also the risk assessment of AFB₁ was summarized in this review.

Geliş Tarihi/Submission Date : 08.10.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 10.12.2019

*This study was presented as a poster presentation in I. International VI. Veterinary Pharmacology & Toxicology Congress on September 04-07, 2019 in Kayseri, Turkey.

Sampling

Sampling is one of the most important steps in all analytical methods. Sample variation endured largest contributing factor for error in the analytical identification of AFB₁ in feeds and feedstuffs. Thus, systematic approaches have been designed and even adapted for sampling method, sample preparation, and analysis of AFB₁ at the parts-per-billion (ppb, ng g⁻¹) level (Saini and Kaur, 2012).

It is preferable to collect sample when lots are in movement as incidences like loading and unloading can be one of the predisposing factor of AFs content in a moving sample from trucks (FAO, 1993). Sample should be constituted by at least 100 incremental (small portions taken to compose an accumulatively bulk sample) grabbed in a systematic but random manner, manually or automatically from the maximum number of points from a lot. Then, It should be packed properly in an humidity free containers such as paper bags or cardboard boxes. Sample details, labelling and tagging should be done properly in next step according to the site of the lot from where it has been collected. Furthermore, sample must be protected against heat and moisture during transportation. It is important to keep it in its original form. Refrigeration can be a preferable practice until analysed. Proper protection from heat and humidity is needed in order to prevent from fungus development (Fonseca, 2002).

Accuracy of sampling can be improved by taking sample in large quantity and dividing them in to three parts. Weight difference have been also taken into consideration (Sinha, 1999). A study performed by Armorini et al. (2015) showed a high heterogeneity associated with the presence of AFB₁ in flour when sample was analyzed from a smaller weight as 5 g to 20 g. So it was concluded in their study that increasing the sample weight (start from 20 g) reduce the variability of AFB₁ level in multiple samples analyzed.

Fonseca (2002) also demonstrated the impact of sample weight on the variation coefficient when sampled shelled peanuts. The bigger the sample, lesser variation noticed on graph. A lot of differences in sample size has been recommended worldwide. Different countries have different requirement in terms of sample weight. For example, The United Kingdom requires a weight of 10.5 kg per grain sample and The Department of Agriculture in United States consider 66 kg per grain sample for AF analysis. Generally, most of the countries accept 5 to 10 kg per grain sample weight. Sub-samples size varies from 20 - 100 g. Mostly methods need a 50 g sample for AF analysis, which seems to be economical in terms of solvents usage (Sinha, 1999).

Sample preparation

Reduction in particle size and homogenization are main aim of sample preparation to make subsamples which represent the parent sample for analysis. Reduction in particle size is carried out in mills/grinders that converts the sample to a paste while simultaneously homogenizing the sample (Davis et al., 2018). In case of non-granular product like milk there is no sample preparation, small portion of milk is taken for further processing. Blending or mixing is important in liquid samples before taking any portion for analysis. Sub-sample size also may vary, but usually it is in the order of 25 to 1000 g depending on particle size (Whitaker et al., 2005).

Extraction and clean-up procedures

Clean-up step is used to remove/reduce any disturbing substrate, that may result in any analytical error while extraction in quantitative step for the analysis. Different extraction methods have been used over the period of time by evolution of this subject (Sizoo et al., 2005). Currently, the extraction of the AFs is done by aqueous polar solvents, and most commonly used substances are methanol or acetonitrile. The solvent selection depends on the chemical composition and analytical of the mycotoxin (Pittet, 2005).

The liquid-liquid extraction is based on the principle of distribution of analytes in two non-miscible phases. The major downside of this process is, it demands organic and chlorinated solvents in significant amount. Consequently, this method has been replaced by solid phase extraction (SPE) method (Sizoo et al., 2005). The SPE column includes a bonding phase which permits selective absorption of contaminants or the substances of interest such as an analyte. Silica traps the ingredient of interest which is analyte and the unwanted substances are washed off. A specific elution solution releases the analyte from the column. The analyte is eluted with specific solutions to it from the column (Yao et al., 2015).

The immunoaffinity column (IAC) are used to reduce the matrix effect which rely on principle that antibodies are raised against the AFB₁ is immobilised on a gel, packed in column. First conditioning of column is done with phosphate buffer solution (PBS) than sample extract is applied. During sample application AFB₁ gets bound to antibody and than to IAC gel. After loading of extract to IAC, gel is washed with PBS to detach any co-extractives and finally AFB₁ is removed from IAC by breaking antigen-antibody bond (Şenyuva and Gilbert, 2010).

Analytical techniques for determination of aflatoxin B₁

Enzyme-linked immune-sorbent assay

Enzyme-linked immune-sorbent assay is a simple, rapid and specific method used for detection and quantification of AFB₁ (as antigen) in a sample using an enzyme-labelled toxin and antibodies specific to AFB₁ test kit (Adi and Matcha, 2018). Along with rapid screening of toxins, these kits coined with some drawback also like cross reactivity and matrix dependence which leads to extreme variation in results (Aksoy et al., 2016).

For the determination of AFB₁ in feeds and feedstuffs direct/indirect competitive ELISA has been used extensively. Low limit of detection (LOD) is one of main advantage of ELISA method based test. A study performed by Aksoy et al. (2009b) for the determination of AFB₁ in compound animal feed in 40 samples by using ELISA. Reported percentage of AFB₁ in compound feed was 95%. In another study conducted by Aycicek et al. (2005) among 40 cacao hazelnut cream and 51 dehulled hazelnut samples AFB₁ existence was reported in 39 and 43 samples of cacao hazelnut cream and dehulled hazelnut with level of <1 to 13 ng g⁻¹ and <1 to 10 ng g⁻¹, respectively.

Chun et al. (2007) validated 85 samples positive for AFs in nuts and nut products, where ELISA used for rapid screening and HPLC for further quantification. For AFB₁ the LOD was 0.08-1.25 ng g⁻¹ and the limit of quantification (LOQ) was 0.15-2.50 ng g⁻¹ respectively and recovery ranged from 83.4% to 102%. In this study, ELISA screening detected 31 positive samples, resulted above 0.06 ng g⁻¹. These samples were further quantified with HPLC, results shows contamination level up to 28 ng g⁻¹ in nine samples. HPLC results demonstrated that about 2/3 of the results were false positive in ELISA. As concerned with the advantage ELISA technique has high output and rapidity in screening.

Thin layer chromatography

Thin-layer chromatography, a technique used for purity assessment, separation, and identification of organic compounds, used quite extensively in the analysis of AFs. This method is quite sensitive and can quantify AFs as low as 1 ng g⁻¹ (Rahmani et al., 2009). Ultraviolet light (UV) is used to examine the developed TLC plates. Visual comparison of the fluorescent intensity of the spots in the sample extracts gives estimation of concentration of AFs in sample being analyzed. These estimated spots are compared with AF standards chromatographed on the same plate (Sinha, 1999).

Stroka et al. (2000) developed a method which is able to detect maximum level of toxin set by Europe-

an Union (EU). They use TLC for determination of AFs in various feed samples. IAC was used prior to TLC. Aflatoxins were analysed by comparing with them AF standards using densitometry. Result shows LOD for AFB₁ in peanut, paprika and pistachios were 0.6, 0.4, and 0.2 ng g⁻¹ whereas LOQ were 1.5, 1.2 and 0.5 ng g⁻¹ while recoveries ranged from 85%, 85% and 82% respectively.

High performance liquid chromatography

High performance liquid chromatography is the most widely and frequently used method with high precision, sensitivity and automation for mycotoxin analysis. Relative affinity is the key principle in this technique where a mixture of compounds present in an extract separates by relative affinity for a stationary column and a mobile solvent (Pittet, 2005).

HPLC has several advantages in comparison to other analytical methods and most important is its potential for automation. Both normal and reversed-phase HPLC can be used in a sample processing. Normal-phase methods use ultraviolet (UV) monitoring at wavelengths of 254 and 365 nm for detection of AFs with native fluorescence and fluorescence with a silica packed cell while reversed-phase have been developed by using both UV and fluorescence detection (FLD). Recently, reversed-phase HPLC method for AFs detection have received significant attention because of fast and accurate detection and rapidity in final results (Wacoo et al., 2014). The only disadvantage with HPLC methods was the complexity in steps for extraction and clean-up, longer time and experience factor (Sinha, 1999).

A modified, reliable and rapid method has been designed based on the "Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe" (QuEChERS) procedure by a single extraction step without exercising a clean-up step for AFB₁ analysis in four feedstuffs comprising fish meal, corn, broken rice and, peanut. Satisfactory results were achieved, including good linearity, specificity, accuracy, precision repeatability, reproducibility and analytical limits (Choochuay et al., 2018).

HPLC coupled with FLD is commonly used along with online post-column derivatization (PCD) for analysis of AFB₁. Kobra cell is typically used to electrochemically brominate the toxin and make it detectable even at low level. Atmaca et al. (2015) analysed the level of AFB₁ in 40 maize grain samples by HPLC using IAC for sample preparation. Samples were quantified with HPLC-FLD with Kobra cell. LOD and LOQ were 0.013 and 0.038 ng g⁻¹, respectively with recovery of 89%.

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

The liquid chromatography tandem mass spectrometry

try (LC-MS/MS) is highly specific and widely applicable analytical method for both qualitative and quantitative analyses. The method have capacity of determining the toxins in a single run (Di Mavungu et al., 2009). Before MS, HPLC separates the sample into chemical compounds after that MS ionizes the molecules, afterward sort and identify the molecules according to their mass-to-charge ratio (Mahfuz et al., 2018).

Njumbe et al. (2015) used LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins including AFB₁ in different sorghum varieties. Result stated LOD for AFB₁ was 2.5 ng g⁻¹ while LOQ was 5 ng g⁻¹. When this method was applied to small portion of samples (10 samples) obtained from different places 9 out of 10 samples (90%) samples were positive for AFB₁.

Souza et al. (2013) worked on 119 samples of poultry feed for the determination of different mycotoxins by using LC-MS/MS. Samples include 74 maize samples, 36 chicken feed and nine feed mill residues. AFB₁ was found in maize samples under value of 3.0 ng kg⁻¹.

Electrochemical immunosensors

In past, many electrochemical immunosensors (ECI) also known as antibody-based biosensor have been developed for the detection of AFB₁. Detection range reported to be as low as 0.03-0.15 ng mL⁻¹ (Azri et al., 2018). For mycotoxin detection by ECIs rely on the use of specific antibodies and aptamers or artificial receptors as affinity ligands which permits binding of the analyte to the sensor for estimation with

0.3 pg mL⁻¹ and recovery of 80% and 127% in spiked peanut samples.

International legislations and regulations

Legally binding regulations have been issued for AFB₁ as this mycotoxin particularly has tendency to contaminate milk as AFM₁. The maximum level has been established by the European Commission to prevent the occurrence of AFM₁ and harmful effect to consumer health (Streit et al., 2012). According to performance criteria of EU, the recovery percentage should be between 50 to 120% in aflatoxin analysis at < 1 µg g⁻¹ spiked level (EC, 2014).

In Turkey and the EU, the maximum levels of AFB₁ for compound feeds for dairy cattle and calves, dairy sheep and lamb, dairy goat and kids, piglet and young poultry animals is 5 ng g⁻¹. The maximum level for AFB₁ in feed ingredients and compound feed of cattle, sheep, goat, pig, poultry (except above) is 20 ng g⁻¹. The maximum level of AFB₁ for complementary and complete feeds (except above) is 10 ng g⁻¹. The maximum levels of AFB₁ for all feeds above is for feedstuff with a moisture content of 12% (MAF, 2014; EC, 2015).

The international regulations for the maximum limit for AFM₁ in milk and dairy products range from 0 to 1 ng g⁻¹. The EU set the limit of AF levels to not more than 20 ng g⁻¹ in lactating dairy feeds and 0.05 ng g⁻¹ in milk (Iqbal et al., 2015).

The FDA action levels for total AFs in animal feed and feed ingredient were shown in Table 1.

Table 1. FDA (2019) action levels for total AFs in animal feed and feed ingredient

Feed or feedstuff	Concentration (ng g ⁻¹)
Corn and peanut products for beef cattle	300
Corn for immature animals and dairy cattle	20
Corn and peanut products for breeding beef cattle and mature poultry	100
Corn and peanut products for finishing swine (> 45.3 kg)	200
Corn and peanut products for finishing beef cattle	300
Cottonseed meal (as a feed ingredient)	300
Corn, peanut product, other feed ingredients and pet feed	20

minimum interference from other components that can occur in a sample. Such affinity based sensors that consist of an electrode with the bioreceptors generate an electroactive signal which offer great selectivity and sensitivity for analyzed samples (Karczmarczyk, 2017).

Masoomi et al. (2013) designed a non-enzymatic sandwich form of an ECI that achieved a detection range of 0.6-110 ng mL⁻¹ and LOD 0.2 ng mL⁻¹ for AFB₁. Azri et al. (2018) worked on determination of AFB₁ in peanut sample. The developed ECI showed a linear range of 0.0001 to 10 ng mL⁻¹ with LOD of

Toxicological risk assessment

Risk assessment is basically carried out on theoretical basis and technical support for quality and safety evaluation, standard establishment and risk management of agricultural and other consumable products (Ding et al., 2015). Toxicological risk is the toxic result of a particular activity/procedure in relation to the likelihood that it may occur which may characterised as a type of the hazard, magnitude of the hazard, and probability of the hazard. With respect to above mentioned definitions, toxicological risk assessment is basically a scientific activity using data from toxicological research. Finally, this leads to foundation of

risk management (Kleijnans, 2003).

Different animal species have different susceptibility for AFB₁ toxicity with oral lethal dose 50 (LD₅₀). The LD₅₀ of AFB₁ differ with age, gender etc. For example LD₅₀ for rabbit, cat, turkey (also puppies and young calves), horse (young foals, also sheep), chickens, mouse, female and male rats are 0.3-0.5, 0.55, 0.5-1, 2, 6.5-16.5, 9, 7.4 and 17.9 mg kg⁻¹, respectively (Dhanasekaran et al., 2011).

International Agency for Research of Cancer (IARC) classified AFB₁ as human carcinogen (group 1) and because of its structural similarity to AFM₁, is classified as carcinogenic (group 2B) (Atmaca and Aksoy, 2015). In this regard, In 1997 the Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) Expert Committee on Food Additives (JECFA) concluded the dietary intake also a potential risk for AFs related carcinogenicity (Sugita-Konishi et al., 2010).

A recent study by Nugraha et al. (2018) on risk assessment for AFB₁ from contaminated maize and peanut was carried out by using margin of exposure (MOE) and estimation of liver cancer risk approaches. The MOE values of maize and wheat consumption were generally below 10.000 and for several occurrence data it was even below 1000. Consumption were above 0.1 cancer cases / 100.000 individuals / 75 years for liver cancer cases associated with AFB₁.

Conclusion

Mycotoxins are emerging issue worldwide, found in feeds and feedstuffs which is potential hazard for both human and animal health. AFB₁ received tremendous attention in several years due to its hepatotoxic and carcinogenic nature. Measures should be taken worldwide by implementing legislations and regulations to control toxic level of AFB₁ in consumable and agricultural products. Analytical methods are still considered a developing area where techniques are being designed to conduct analysis with time and cost efficiency and user friendly with highest possible accuracy.

References

- Adi PJ, Matcha B. Analysis of aflatoxin B₁ in contaminated feed, media, and serum samples of *Cyprinus carpio* L. by high-performance liquid chromatography. *Food Qual Saf* 2018; 2: 199-204.
- Aksoy A, Das YK, Yavuz O, Guvenc D, Cetinkaya MB, Kokcu A, Celik S. Aflatoxin M₁ level of human breast milk samples in Samsun and neighbour provinces, Turkey. *Fresenius Environ Bull* 2009a; 18(5b): 832-5.
- Aksoy A, Yavuz O, Guvenc D, Das YK, Terzi G, Celik S. Determination of aflatoxin levels in raw milk, cheese and dehulled hazelnut samples consumed in Samsun province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 513-6.
- Aksoy A, Yavuz O, Das YK, Guvenc D, Muglali OH. Occurrence of aflatoxin B₁, T-2 toxin and zearalenone in compound animal feed. *J Anim Vet Adv* 2009b; 8(3): 403-7.
- Aksoy A, Atmaca E, Yazici F, Güvenç D, Gül O, Dervişoğlu M. Comparative analysis of aflatoxin M₁ in marketed butter by ELISA and HPLC. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22(4): 619-21.
- Armorini S, Altafini A, Zaghini A, Roncada P. Occurrence of aflatoxin B₁ in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling. *Food Cont* 2015; 50: 858-63.
- Atmaca E, Güvenç D, Aksoy A. Determination of aflatoxin levels in maize grain by high performance liquid chromatography using an immunoaffinity column cleanup. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2015; 21(4): 619-2.
- Atmaca E, Aksoy A. Toksikolojik açıdan yemlerde oluşabilecek doğal kaynaklı risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Anim Nutr & Nutr Dis-Special Topics* 2015; 1(1): 32-42.
- Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Cont* 2005; 16(3): 263-6.
- Azri FA, Sukor R, Selamat J, Abu Bakar F, Yusof NA, Hajian R. Electrochemical immunosensor for detection of aflatoxin B₁ based on indirect competitive ELISA. *Toxins (Basel)* 2018; 10(5): E196.
- Choochuay S, Phakam J, Jala P, Maneeboon T, Tan-sakul N. Determination of aflatoxin B₁ in feedstuffs without clean-up step by high-performance liquid chromatography. *Int J Anal Chem* 2018; Article ID: 4650764.
- Chun HS, Kim HJ, Ok HE, Hwang JB, Chung DH. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chem* 2007; 102(1): 385-91.
- Davis JP, Jackson MD, Leek JM, Samadpour M. Sample preparation and analytical considerations for the US aflatoxin sampling program for shelled peanuts. *Peanut Sci* 2018; 45(1): 19-31.
- Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. Guevara-Gonzales RG. ed. In: *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*.

- London: IntechOpen, 2011; pp. 221-54.
- Ding X, Wu L, Li P, Zhang Z, Zhou H, Bai Y, Chen X, Jiang J. Risk assessment on dietary exposure to aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts in the Yangtze River ecological region. *Toxins* 2015; 7(10): 4157-74.
- Di Mavungu JD, Monbaliu S, Scippo ML, Maghuin-Rogister G, Schneider YJ, Larondelle Y, Callebaut A, Robbens J, Van Peteghem C, De Saeger S. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit Contam* 2009; 26(6): 885-95.
- EC. Commission Regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. *Official Journal of the European Union*. Date: 17.5.2014. Number: L 147/29.
- EC. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council. of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union*. Date: 27.02.2015. Number: 02002L0032 - EN - 019.006-1.
- Essiz D, Altintas L, Das YK. Effects of aflatoxin and various adsorbents on plasma malondialdehyde levels in quails. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006; 50(4): 585-8.
- FAO. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. *Food and Nutrition Paper 55*. Report of an FAO technical consultation Rome, 3-6 May 1993. <http://www.fao.org/3/a-t0838e.pdf>; Accessed Date: 19.09.2019.
- FDA. Action levels for aflatoxins in animal food. Sec. 683.100 U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Office of Regulatory Affairs and Center for Veterinary Medicine. March 2019. <https://www.fda.gov/media/121202/download>; Accessed Date: 19.09.2019.
- Fonseca H. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: An update. *Brazil J Microbiol* 2002; 33(2): 97-105.
- Iqbal SZ, Jinap S, Pirouz AA, Faizal AA. Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends Food Sci Tec* 2015; 46(1): 110-9.
- Karczmarczyk A. Development of Biosensors for Mycotoxins Detection in Food and Beverages. PhD Thesis. Universität Regensburg, Regensburg-Germany, 2017.
- Kleinjans JC. Principles in toxicological risk analysis. *Toxicol Lett* 2003; 140: 311-5.
- Manetta AC. Aflatoxins: Their measure and analysis. Torres-Pacheco I. ed. In: *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*. Rijeka: IntechOpen, 2011; pp. 93-108.
- Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B₁ and M₁: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins* 2018; 10(6): 214.
- Masoomi L, Sadeghi O, Banitaba MH, Shahrjerdi A, Davarani SS. A non-enzymatic nanomagnetic electro-immunosensor for determination of aflatoxin B₁ as a model antigen. *Sensor Actuat B: Chem* 2013; 177: 1122-7.
- Mahfuz M, Gazi MA, Hossain M, Islam MR, Fahim SM, Ahmed T. General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: A review. *Toxin Rev* 2018; 12: 1-5.
- MAF. Communiqué on Undesirable Substances in Feed (2014/11). Ministry of Agriculture and Forestry. *Turkish Official Journal*. Date: 19.04.2014. Number: 28977.
- Njumbe EE, Van Poucke C, De Saeger S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chem* 2015; 177: 397-404.
- Nugraha A, Khotimah K, Rietjens IM. Risk assessment of aflatoxin B₁ exposure from maize and peanut consumption in Indonesia using the margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches. *Food Chem Toxicol* 2018; 113: 134-44.
- Pittet A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 2005; 96(6): 424-44.
- Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2009; 8(3): 202-51.
- Şenyuva HZ, Gilbert J. Immunoaffinity column cleanup techniques in food analysis: A review. *J Chromatogr B* 2010; 878(2): 115-32.
- Saini SS, Kaur A. Aflatoxin B₁: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review. *Global Adv Res J Chem Mater Sci* 2012; 1(4): 63-70.
- Sinha KK. Testing methods for aflatoxins in foods. *Food Nutr Bull* 1999; 20(4): 458-64.
- Sizoo EA, van Egmond HP. Analysis of duplicate 24-

hour diet samples for aflatoxin B₁, aflatoxin M₁ and ochratoxin A. *Food Addit Contam* 2005; 22(2): 163-72.

Souza MD, Sulyok M, Freitas-Silva O, Costa SS, Brabet C, Machinski Junior M, Sekiyama BL, Vargas EA, Krska R, Schuhmacher R. Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *The Scientific World Journal* 2013; Article No: 427369.

Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed - Focus on Europe. *Toxins* 2012; 4(10): 788-809.

Stroka J, Van Otterdijk R, Anklam E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *J Chromatogr A* 2000; 904(2): 251-6.

Sugita-Konishi Y, Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Sugiyama K, Kamata Y. Exposure to aflatoxins in Japan: Risk assessment for aflatoxin B₁. *Food Addit Contam* 2010; 27(3): 365-72.

Wacoo AP, Wendi D, Vuzi PC, Hawumba JF. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. *J Appl Chem* 2014; Article ID: 706291.

Whitaker TB, Slate AB, Johansson AS. Sampling feeds for mycotoxin analysis. Diaz DE. ed. In: *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham: Nottingham University Press, 2005; pp. 1-23.

Yao H, Hruska Z, Di Mavungu JD. Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin J* 2015; 8(2): 181-91.



Köpeklerde Retinanın Tanısal Görüntülenmesi

Özlem ŞENGÖZ ŞİRİN¹, Gözde ARIKAYA¹

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Özlem ŞENGÖZ ŞİRİN; Email: sengozoeklem@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2232-6349

Atıf yapmak için: Şengöz Şirin Ö, Arıkaya G. Köpeklerde retinanın tanısal görüntülenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 180-186.

Özet: Oküler yapıların önemli bir bölümü doğrudan ya da dolaylı yoldan muayene edilebilir. Kapsamlı bir oftalmik muayene yapılarak göz hastalıklarının birçoğuna hızlı ve hatasız teşhis koymak mümkün olabilmektedir. Retina, optik sinir vasıtası ile direk beynin ön bölümüne bağlanır. Görme bozukluklarının değerlendirilmesi için retinayı etkileyen hastalıkların önceden belirlenmesi sağaltıma erken başlama ve prognoz açısından oldukça önemlidir. Gelişmiş görüntüleme teknolojileri sayesinde, hastaların patolojilerinin gösterilmesinde, sunulmasında ve paylaşılmasında büyük yol alınmıştır. Bu "derleme" köpeklerde retinanın tanısal görüntülenmesi ile ilgili bilgileri toplayarak hastalıkların tespitini kolaylaştırmak amacıyla sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Köpek, oftalmoskopi, retina, retinanın görüntülenmesi

Diagnostic Imaging of Retina in Dogs

Summary: A significant number of ocular structures can be examined either directly or indirectly. With a comprehensive ophthalmic examination, it is possible to quickly and accurately diagnose most ocular diseases. The retina is connected directly to the anterior part of the brain via the optic nerve. The prediction of diseases affecting the retina is very important for the evaluation of visual impairment in terms of early onset of treatment and prognosis. Owing to sophisticated imaging technologies, a great advancement has been taken for the demonstration, presentation and sharing of patient pathologies. In this review, it is presented to facilitate the detection of diseases by collecting information about the diagnostic imaging of the retina in dogs.

Key words: Dog, ophthalmoscopy, retina, retina imaging

Giriş

Retina görmeyi sağlayan ışığa duyarlı hücrelerin bulunduğu göz tabakasıdır. Beyin ile doğrudan bağlantılı olan retinada şekillenen bozukluk ve patojeniteler doğrudan görme duyusunu etkiler. Görme bozukluklarının değerlendirilebilmesi için retinanın fonksiyonlarının ve retinayı etkileyen hastalıkların bilinmesi gerekir. Geri dönüşümsüz bir hasara neden olmadan retinayı etkileyen hastalıkların önceden belirlenmesi sağaltıma erken başlama ve prognoz açısından oldukça önemlidir. Köpeklerde retinada şekillenen bu patojeniteler tanısal olarak direkt oftalmoskopi, indirekt oftalmoskopi, akıllı telefon tabanlı oftalmoskopi, taramalı lazer oftalmoskop (SLO), optik koherens tomografi (OKT), floresein anjiyografi (FA), ultrasonografi (USG) ve elektoretinografi (ERG) yöntemleri ile görüntülenebilmektedir (Gelatt ve ark., 2013).

Direkt Oftalmoskopi ve İndirekt Oftalmoskopi

Direkt oftalmoskopi yönteminde, ışık bir ayna veya prizma yoluyla hastanın gözüne yönlendirilir ve oftalmoskoptaki bir mercekle yoluyla muayeneyi yapan hekimin gözüne geri yansıtılır (Ollivier ve ark., 2007). Oftalmoskopta izlenen görüntü, muayenesi yapılan

hayvan türüne göre olduğundan daha büyük, düz ve gerçektir (Smith, 2014). Direkt oftalmoskoplarda bulunan rekoss diski ve ayrı bir kadran veya anahtar ile hastanın gözüne gönderilecek ışığın boyutu, şekli ve rengi ayarlanır. Büyük boy ışık hüzmeleri, pupilla çok küçük olduğu durumlarda, orta boy ışık hüzmeleri, karanlık odadaki pupillar açıklıkta ve küçük boy ışık hüzmeleri ise pupilla çok küçük olduğu durumlarda kullanılır. Kırmızı ışık; retina damarlarını ve sinir lifi katmanını değerlendirmek için kullanılırken aynı zamanda siyah görünen hemorajiyi, normal pigment ve kahverengi görünen melanomlar gibi pigmentli lezyonlardan ayırmak için de kullanılır. Parselli ışık hüzmeleri fundus lezyonlarının boyutunu ölçmek için genellikle 16 kareli bir ızgaradan oluşur. Mavi filtre retinanın sinir lifi tabakasını incelemek ve floresein boyasının varlığını vurgulamak için kullanılabilir. Slit-lamp hüzmeleri, fundustaki çökme ve yükseltmelerin belirlenmesinde kullanılır (Maggs ve ark., 2008).

İndirekt oftalmoskopinin gerekli bileşenleri güçlü, fokal bir ışık kaynağı ve konveks bir mercektir. Hekim ile mercek arasında sanal ve ters bir görüntü oluşur. İndirekt oftalmoskopide +5.5'den +90 diyoptriye kadar geniş diyoptri aralığına sahip çok sayıda mercek mevcuttur (Martin 2005). İncelenmekte olan gözün büyüklüğü ve muayeneyi yapan hekimle ilgilenilen lezyon arasındaki çalışma mesafesi büyütmeyi etkile-

yeceğinden, lezyonların herhangi bir ölçüm birimiyle değil optik diskin çapı ile karşılaştırılması önemlidir. Optik sinir tanımlandıktan ve muayene edildikten sonra, fundusun tapetal bölgesi, nontapetal bölgesi, fundusun periferi ve retinal vaskülarizasyon ayrıntılı olarak incelenmelidir (Gelatt, 2014). Geniş fundus görünümü sağladığı için lezyonlar indirekt oftalmoskopi ile tespit edilir ve daha ayrıntılı görüş sağlayan direkt oftalmoskopiyle lezyon incelenir (Murphy ve Howland, 1987).

Oftalmoskopik muayene ile bazı hastalıklar teşhis edilse de genellikle klinik belirtiler patolojiye işaret eder. Hipo reflektivite retina dekolmanı, koroid efüzyonu, inflamatuvar eksudatlar veya neoplaziyi gösterirken, hiper reflektivite önceden belirlenmiş türlerde veya daha önce toksik, enfeksiyöz veya inflamatuvar bir maruz kalma sonucu kalıtsal olabilen retinal atrofiyi veya dejenerasyonu belirtir. Oftalmoskop ile yapılan muayenelerde pigmentasyon ve renk değişiklikleriyle, nontapetal bölgede pigment kaybı, hiperpigmentasyon veya pigment kümelenmeleri şeklinde karşılaşılar. Retina damarlarındaki dejeneratif hastalıklarda zayıflama, dilatasyon ve dolgunluk olurken bazı sistemik hastalıklarda renk kaybı ve inflamasyon durumlarında perivasküler manşet oluşumu görülebilir (Smith, 2014). Kanamalar genellikle hipertansiyona sahip yaşlı kedilerde veya kaogülapati, hiperviskozite ve sistemik bir hastalığa sahip hayvanlarda retinanın farklı bölgelerinde olabilir. Subretinal kanamalar sıklıkla büyüktür ve koyu renklidir. İntraretinal kanamalar nokta tarzında lekeler gibi daha küçük ve soluk renklidir. Yüzeysel retina kanamaları ganglion hücrelerinin sinir liflerini izlemesi nedeniyle alevlenme şeklindedir. Vitreal kanamalar ise klasik büyük-yassı gemi görünümüne sahiptir. Optik disk renk, boyut ve şekil olarak değişiklikler gösterebilir (Smith, 2014; Turner, 2010). Neoplazi gibi durumlarda, basınçtan dolayı optik disk daha büyük görülür ve pupiller refleks kaybolur. Ayrıca, kiazmal yolların etkilendiği neoplazilerde de optik disk daha küçük görülür (Turner, 2010).

Çeşitli göz patolojileri fokal (tek odaklı), multifokal (çok odaklı) veya total retina ayrılmalarına neden olabilir. Sınırlı ve küçük bir alanda oluşan retina dekolmanı, görüş bozukluklarına yol açmayabilir fakat total olarak meydana gelen dekolmanlar körlük ile sonuçlanır ve periferik retinanın yırtılmasına neden olabilir (Bauer ve ark., 2016). Oftalmoskopik muayene sırasında retina yüzeyinin ve retinal kan damarlarının öne doğru geldiği görülür. Eğer periferik retina yırtığının da eşlik ettiği total bir retina dekolmanı şekillenir ise dürüm şeklini alan retina arka tarafta optik diske bağlı kalacaktır (Gelatt ve ark., 2013; Smith, 2014). Bu gibi durumlarda retinanın nörosensör tabakası, korpus vitreumda grimsi bir perde şeklinde asılı kalır (Bauer ve ark., 2016). Açığa çıkan tapetum üzerini örten bir retina olmadığı için hiperreflektif görüntü verir (Turner, 2010).

Akıllı Telefon Tabanlı Oftalmoskopik Görüntüleme

Akıllı telefonların görüntü yakalama ve paylaşma kolaylığı, teknolojideki hızlı gelişmeler ile birlikte oftalmolojide klinik görüntüleme aracı olarak kullanılmasına neden olmuştur (Haddock ve ark., 2013). Akıllı telefon kamerasının ışığı, oftalmoskopun ışığının yerini alırken, havadaki görüntüyü kaydeden akıllı telefon kamerası da muayeneyi yapan hekimin gözünün yerine geçer ve ekranda ters bir görüntü oluşur (Kanemaki ve ark., 2017; Khanamiri ve ark., 2017). Telefona sabitlenebilen küçük bir optik cihaz yardımıyla telefon kamerasının lensinden elde edilen görüntü düz bir şekilde ekrana yansıtılarak fundusun görüntülenmesi sağlanır (Balland ve ark., 2017).

Akıllı telefon oftalmoskopik görüntüleme sistemiyle oküler patolojiler belirlenebilir. Klinik muayene ile katarakt, glaukom, yaşa bağlı makülopati, koryoretinal atrofi, skar, sistemik bozukluklar (hipertansiyon veya diyabetik retinopati), retinitis pigmentosa, posterior vitreus dekolmanı ve retina dekolmanı belirlenebilir. Arka segmentin anatomik yapıları görüntülenirken, video kaydı ile venöz sirkülasyon ve vitreus boşluğunda yüzen üveal kistler gibi dinamik olayların gözlemlenmesine olanak sağlanır. Ayrıca, fundus muayenesinin video kaydı, yapay yansımalar ve gerçek patolojik hiper reflektivite (retinal atrofi) değişikliklerinin kolayca fark edilmesine izin verir. Video kaydı incelenirken, yapay yansımaların ışık kaynağı ile birlikte hareket ettiği ve patolojik hiper reflektivite alanlarının ise ışık kaynağından bağımsız bir şekilde parlak alanlar olarak kaldığı gözlenmiştir (Balland ve ark., 2017).

Taramalı Lazer Oftalmoskopi

Taramalı lazer oftalmoskop (SLO) fundusun oldukça paralel, yaklaşık 1 mm çapındaki monokromatik, düşük enerjili ışık (670 nm, diod lazer) demeti ile retinanın yaklaşık 10 mikron çapındaki noktasal alanının taranması ve geri saçılan ışık yoğunluğunun ölçülmesine dayanır (Sharp ve ark., 2004). Kısa ve uzun dalga boyundaki lazerler, fundus görüntüsünün elde edilmesini, yansıma ve iletim özelliklerinden dolayı belirli doku tabakaları hakkında bilgi sahibi olunmasını ve fundus floreseinin anjiyografi (FFA) ve indosiyenin yeşili anjiyografisinin (İSYA) uygulanabilmesini sağlar (Theelen ve ark., 2010).

insan glaukomunda SLO yöntemi optik sinir başında (OSB) oluşan değişikliklerin teşhisi ve takibinde OSB'nin gerçek ve 3 boyutlu kesitsel görüntülerini verir (Gelatt, 2014). Optik disk görünümü, görme alanı ve göz içi basıncı değerleri glaukom tanısı ve takibinde önem taşır. Retina sinir lifi tabakası (RSLT) ve OSB glaukomatöz doku hasarının morfolojik olarak belirlenebileceği yapılardır ve optik disk çukurluğu (Cup) fizyolojik olarak disk ile patolojik olarak glaukomatöz hasarla ilişkilidir. Hastaların her iki gözünde-

ki cup'ların çoğunlukla simetrik olduğu, bunun yanında glaukumlu olgularda cup'ların daha büyük ve sıklıkla da asimetrik olduğu bildirilmiştir (Zangwill ve ark., 2004). Glaukom hastalarında görme alanı kaybı ve OSB'de çukurlaşma ortaya çıkmadan önce RSLT'nin hasarının önemli ölçüde olduğu ve fonksiyonel kayıp ortaya çıkıncaya kadar yaklaşık yarısının geriye dönüşümsüz hasara uğradığı bilinmektedir. Optik sinir başı değişikliklerinin belirlenmesi ve ayırıcı tanının yapılabilmesi için kullanılan Heidelberg retina tomografisi (HRT) konfokal tarayıcı lazer oftalmoskopi prensibi ile çalışan optik disk ve peripapiller retina bölgesinin üç boyutlu olarak görüntülenmesini sağlayan ve retina üzerinde aynı noktaların tekrarlanan görüntüsüne izin veren bir cihazdır (Tekin ve Yaşar, 2015). Son versiyon olan HRT-3, optik sinir başı ve retina sinir lifi tabakasındaki değişikliklere göre glaukom olasılığını ve takip sırasında oluşan değişiklikleri ortaya çıkarmak için önemli Moorfields Regresyon Analizi ve Glaukom İhtimali Skoru yazılımlarına sahiptir (Zangwill ve ark., 2007).

Heidelberg retina anjiyografisi (HRA), eşzamanlı FFA ve İSYA için tasarlanmış konfokal lazer tarama sistemi şeklinde HRT'nin adapte edilmiş halidir. Klinikte FA ve İSYA uygulaması lipofuksin birikiminden kaynaklanan fundus otofloresanının ölçümü için kullanılır. Retina ve koroidal damarlardaki kan akımının dinamik değerlendirilmesini sağlayan kısa filmlerin ve görüntülerin yüksek hızlı kazanımını sağlar. Kızılötesi dalga boyu sayesinde kataraktlı, korneal opasiteli ve kanamalı gözlerde normal fundus fotoğraflarına göre daha iyi görüntüler alınır. Bu teknik apoptozisin görüntülenmesi, kan-retina bariyeri çalışmaları, retina gangliyon hücrelerinin görüntülenmesi, bağışıklık yanıtının değerlendirilmesi ve kök hücrenin görüntülenmesi gibi çeşitli uygulamalarda oftalmolojinin preklinik araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ramos de Carvalho ve ark., 2014). Morfolojik anormalliklerin gözlemlendiği durumlarda, bunların terapötik müdahale ile tersine çevrilmesi de SLO ile takip edilebilir (Seeliger ve ark., 2005).

Optik Koherens Tomografi

Optik koherens tomografi (OKT), biyolojik dokulardan mikron çözünürlüğünde tomografik kesitlerin elde edildiği bir görüntüleme tekniğidir. Bu nedenle non-invaziv doku biyopsisi olarak da tanımlanır (Fujimoto, 2003). Optik koherens tomografi'nin, yüksek çözünürlüklü kesitlerde retina kalınlığı, retinanın yapısı ve yansıtıcılık özelliklerindeki değişiklikleri göstermesi ile niceliksel ölçümlerin yapılması, takibi ve tedavi sonucunun objektif ve non-invaziv olarak değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (Gelatt ve ark., 2013). Ayrıca OKT, glaukomatöz hastalarda peripapiller RSLT kalınlık ölçümü, OSB analizi, gangliyon hücre kompleksi analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bendschneider ve ark., 2010).

Optik koherens tomografi'de görüntü, retina tabakala-

rının farklı optik yansıtıcılık özelliklerine bağlı olarak dokulardan geri yansıyan ışığın yoğunluğuna göre beyazdan siyaha doğru değişen gri skala ile görüntü oluşturulmaktadır. Vitreus, fotoreseptörler, iç nükleer tabakada yer alan bipolar, horizontal ve müller hücrelerinin nükleusları gibi düşük yansıtıcılığı olan yapılar siyah olarak, RSLT ve RPE gibi yüksek yansıtıcılığı olan yapılar beyaz renkte kaydedilir (Afrashi, 2015). Dış ve iç pleksiform tabaka ise yerleşim özelliği nedeniyle orta-yüksek yansıma gösterecek şekilde görüntülenir. Bu şekilde değerlendirilen dokular bir bilgisayar programı yardımıyla renkli görüntülere dönüştürülür, beyaz alanlar sarı ve kırmızı, gri alanlar mavi, siyah alanlar ise lacivert-siyah renge dönüşür (Batioğlu, 2010). Işığı şiddetle yansıtan dokuya ait güçlü ışık sinyalleri hiper reflektivite, ışığı zayıf yansıtan dokulardan gelen düşük sinyaller ise hipo reflektivite olarak yorumlanır. Doku içinde daha yüzeysel konumdaki yüksek yansıma özelliğine sahip bir yapı veya lezyon, altındaki dokulara ışığın geçmesini engelleyerek gölgelenme oluşturur ve doku görülemez, gölgelenme koridorları ve noktasal gölgelenme meydana gelir (Örn. vitreus opasiteleri, sert eksudalar, kanamalar gibi). Retina pigment epiteli ışığı absorbe eden ana kaynaktır. Bu hücrelerin atrofisi, pigmentli dokuların kaybına neden olacağından ters gölgelenme ortaya çıkar (Lee ve Bosen, 2015).

Birçok koryoretinal hastalığın tanı ve tedavi takiplerinde OKT önemli bir seçenektir. Ayrıca, zamanla gelişebilen morfolojik retina değişikliklerini takip etme imkanı sağlamaktadır. Retinal ve OSB hastalıklarının izlenmesi için OKT sıklıkla tercih edilir. Akut optik nörit, RSLT incilmesi ve diğer nöropatileri takiben glaukom dahil olmak üzere birçok hastalıkta görülür ve yapısal kaybı değerlendirmek için oldukça hassas bir yöntem olarak kullanılabilir. Fundoskopik olarak belirlenebilir lezyonlar oluşmadan önce, OKT doku kalınlıklarındaki ince değişiklikleri ayırt edebilir (Gelatt ve ark., 2013). Retina arter dal tıkanıklıkları en sık olarak embolizm sebebiyle meydana gelmektedir. Akut ve ağrısız gelişen, genellikle santral görmenin korunduğu görme alanı kayıplarına neden olur. Tıkalı arterin beslediği retina bölgesi hücre içi ödem sonucu oluşan bulanık şişme nedeniyle beyaz renkte görülür (Fujimoto, 2003; Sönmez ve ark., 2008). Histopatolojik çalışmalarda, retina arter tıkanıklığında hücre içi ödem ve iç retina katmanlarında iskemi olduğu saptanmıştır. Akut dönem OKT tetkiklerinde, düşük reflektiviteli kistoid alanların izlenmediği, yüksek reflektivite gösteren retina kalınlaşması görülmüştür. Bu durum retina arter tıkanıklığında ödemin hücre dışı alandan ziyade hücre içinde geliştiği bulgusunu desteklemektedir. İç retina katmanlarındaki reflektivite artışı ise bu alanda gelişen iskemi ve koagülatif nekroz ile ilişkili olabilir (Sönmez ve ark., 2008).

Floresin Anjiyografisi

Floresin anjiyografisi; fundustaki normal ve anormal vasküler yapılara ait bozuklukları karakterize etmek

amacıyla, deneysel olarak veya klinik olgularda uygulanabilen bir görüntüleme tekniğidir. Floresein intravenöz enjekte edildikten sonra oftalmik arterden oküler dolaşıma geçer (Friberg ve ark., 2008). Floresein anjiyografi koroidal ve retinal vaskülarizasyonun akış paternleri ile karakterize dinamik bir süreçtir. Bu paternler köpeklerde bir dizi temporal faza bölünmüştür. Bu fazlar;

- 1- Preretinal veya koroidal faz,
- 2- Retinal arteriyel faz,
- 3- Retinal arteryovenöz faz,
- 4- Retinal venöz faz ve

5- Geç evre (floreseinin kaybolduğu ve bir sirkülasyon daha içeren faz) olarak bölümlendirilmiştir. Floresein anjiyografide patolojiler otofloresans, hiperfloresans veya hipofloresans şeklinde ortaya çıkar. Bu patolojilerin lokalizasyonu, boyutu, hangi temporal anjiyografi fazı sırasında karşılaşıldığı tanı açısından önemlidir (Gelatt ve ark., 2013).

Gözdeki floroforlar özel bir dalganın ışığı tarafından uyarıldığında gözde otofloresans kaydedilir. Bu ürünler gözde doğal olarak var olabilirler veya bir hastalık sürecinin (drusen, lipofuksin) yan ürünü olarak birikebilirler. Optik disk drusenleri veya seroid lipofuksinozisi olan hastalarda otofloresans kaydedilir. Hipofloresans floresansın bloke edilmesiyle ilişkilidir. Hipofloresans, vitreal veya intraretinal hemorajide görülebilir. Ayrıca, retinal oklüzyonlar veya azalan doku perfüzyonu gibi vasküler dolum kusurlarına bağlı olarak da gelişebilir (Gelatt ve ark., 2013). Jeografik atrofi'de olduğu gibi vasküler yapının kaybı söz konusu olduğunda floresein iletimi olmayacağı için yine hipofloresans gözlenecektir (Kerimoğlu, 2015). Hiperfloresans bir pencere defekti veya damarlardaki geçirgenlik artışında floresein birikimiyle meydana gelir. Neovasküler damarlarda normal retina damarlarında olduğu gibi damar iç çeperi sıkı bağlantılı endotel hücrelerinden oluşmaz. Bu nedenle retinal neovaskülarizasyonda olduğu gibi neovasküler damarlar floreseini sızdırır. İç kan retina bariyerinin bozulması sonucu (diyabetik retinopati, vaskülit) retina damarlarından sızıntı oluşabilir. Santral seröz koryoretinopatide olduğu gibi koroidal damarlardaki genişleme ve geçirgenlik artışı sonucu RPE'den floresein sızıntısı görülebilir. Bu gibi durumlarda floresein sızıntısı mürekkep lekesi veya sigara dumanı olarak adlandırılan sızıntı paterni gösterir. Papilödemde optik disk başından floresein sızıntısı görülebilir. Floresein potansiyel doku boşluklarında birikerek göllenme meydana getirir (RPE dekolmanı, RPE'den sızıntı sonucu eksudatif retina dekolmanı) ve hiperfloresans oluşturabilir. Normalde floresein sızdıran koryokapillarisden sızan floreseinin, floreseini tutan solid doku veya drusen gibi dokularda birikmesi sonucu anatomik yapıları boyadığı görülebilir. Geç dönemde floresansın yoğunluğunun artması

ancak lezyon sınırlarının genişlememesiyle karakterizedir, örneğin, skar oluşumuna bağlı lezyon boyanır. Sağlam dokunun olmayışı veya doku kaybıyla ilişkili olarak floresanın birikimi pencere defekti oluşumuna neden olabilir. Koryokapillaris floresansı belirgin olarak RPE atrofi ile birlikte epitel bariyerinin bozulması sonucu görülür (Gelatt ve ark., 2013; Kerimoğlu, 2015).

Floresein anjiyografi, koroidal veya retinal neovaskülarizasyon, anevrizmalar, artmış vasküler permeabilite, iskemi veya damar tıkanıklıkları dahil olmak üzere arka segment dolaşımındaki değişiklikleri değerlendirmek için kullanılır. Floresin anjiyografi, diyabetik retinopati gibi retinal bozuklukların araştırılmasında yararlıdır ve hastalıkların çeşitli aşamaları boyunca vasküler geçirgenliklerin ve aynı zamanda tedaviye verilen yanıtların görüntülenmesine olanak sağlar. Damar içi olmayan hastalıkların tedavilerini, arka segment sirkülasyonu (örneğin, kısmi retina dekolmanı için diyot lazer retinopeksi) üzerindeki etkisini değerlendirmek için objektif bir araç olarak kullanılmıştır (Gelatt ve ark., 2013).

Ultrasonografi

Ultrasonografi, oftalmik muayenenin yapılamadığı, oküler ortamların birisinde opasite veya bulanıklık bulunan (kornea ödemi, hifema, katarakt, vitreus kanaması) gözler ile, oküler travma veya şüpheli orbital hastalığı olan gözlerde endikedir. Ayrıca göz içi ve orbital yapıların biyometrik ölçümleri, aksiyal bulbus okülü uzunluğu belirlenerek uygun yapay lens gücünün hesaplanmasında kullanılır (Dar ve ark., 2014). Göz ultrasonografisinde, yüksek frekanslı probun seçimi mevcut ekipman ile görüntülenecek olan göz ve orbita kısmı dikkate alınarak yapılır. Göz ve orbitanın görüntülenmesinde 7.5-50 MHz arasında değişen problar kullanılmaktadır (Byrne ve Green, 2002). Retina ve optik sinir başına ait detayları görüntülemeye 20 MHz problar ile yüksek çözünürlükte görüntüler elde edilir (Hewick ve ark., 2004). Ancak 10 MHz problara göre düşük penetrasyon yeteneğine sahip olduklarından orbital lezyonları değerlendirmede başarılı değildir (Coleman ve ark., 2004). Göz küresinin ultrasonografik görüntülenmesinde; direkt kornea, göz kapakları veya göz üzerine konulan su kesesi aracılığıyla yapılmak üzere üç metottan yararlanılmaktadır (Pennick ve Anjou, 2008).

Göz küresindeki ve orbitadaki yapılar transdusere geri dönen ekoya göre görüntüde hipokoik, hiperekoik ve anekoik alanlardan oluşur. Bu ekolar, A-mod ekseninde vertikal yükseltmeler veya B-modunda parlak, yansıyan noktalar olarak görünür (Gelatt ve ark., 2013). Posterior segmentteki retina, koreoid ve sklera ekografik olarak birbirinden ayırt edilemez ve birbiriyle birleşik olarak görüntülenir. Orbital yumuşak doku yağ, bağ dokusu, sinirler ve kan damarlarından oluşur ve B-modunda oldukça yansıtıcı ve heterojen bir

alan olarak tasvir edilir ve A-modunda üzerinde farklı yükseklikte kademeli olarak azalan bir dizi eko ile temsil edilir. Optik sinir, orbitanın medio-ventral kısmında koni şeklinde, uzamış hiporeflektif bir alan olarak ve retrobulbar kaslar, göz küresinin eklenti organları olarak ince, uzatılmış hipoekoik yapılar olarak görülebilir. Vitreustaki patolojik değişiklikler kanama, enfeksiyon, zar oluşumu, dejenerasyon ve embriyolojik kalıntıları içerir. Akut hemoraji ve enflamatuvar hücreler, düşük veya orta derecede yansıtıcılığa sahiptir ve dağınık noktalara benzer ekoları üretir (Byrne ve Green, 2002). Şiddetli oküler hemorajide, vitreusta akustik direnç değişimi nedeniyle posterior oküler duvarda eko oldukça zayıflamıştır. Kan pıhtılarının birleşmesiyle artan yansıtıcılık, USG'de kitle benzeri görünüme sahiptir ve intraoküler neoplazi olarak yanlış yorumlanabilir. Uzun süreli kanama veya enflamasyon sonucunda vitreusta membran benzeri oluşum gözlenebilir (Gelatt ve ark., 2013). Ultrason muayenesinde total retina dekolmanı görünümü tipiktir. Sağlıklı posterior oküler duvar USG ile görüntülendiğinde sklera, koroid ve retina birbirine yapışık durumdayken, ayrılmış retina, optik diske ataşmanlar ile yönelmiş ve bir martının kanatlarını andıran oldukça ekojenik, sürekli, lineer bir yapı olarak görülür (Dar ve ark., 2014). A-modunda, ultrason ışını retina dekolmanına dik olarak yönlendirildiğinde %100 sivri bir yükseklik görüntülenir (Gelatt ve ark., 2013). Yeni oluşan retina dekolmanında retinanın dalgalı hareketi gözlenirken, uzun süredir var olan retina dekolmanında, retina genellikle açık veya kapalı olabildiği gibi benzeri bir zar şeklinde görüntülenir (Byrne ve Green, 2002). Orbital lezyonların çoğu (apse, neoplazi), normal orbital dokudan daha homojen bir bileşime sahiptir ve klinik semptomlar oluşturabilecek kadar büyükse kolaylıkla saptanabilir. Lezyonun tipine göre, etkilenen alan daha yüksek veya daha düşük yansıtma sergileyebilir. Apse, çok düşük bir iç yansıtıcılığa sahip kist benzeri, iyi aydınlatılmış bir alan olarak tanımlanabilir. Buna karşılık orbital neoplazi, artan yansıtıcılık ve daha invaziv bir büyüme davranışı ile karakterizedir (Mason ve ark., 2001).

Elektroretinografi

Elektrodiagnostik testler tüm hayvanlarda retinadan, görme korteksine kadar görsel sistemin çeşitli bölümlerinde ortaya çıkan elektrik potansiyelini ölçer. Bu nedenle, tek başına bir görme ölçütü olarak düşünülmemelidir (Nedev ve Simeonova, 2017). Elektroretinografi (ERG) retina içindeki farklı hücrelerin oluşturduğu karmaşık yanıtlarla retinal işlevin değerlendirilmesinde izin veren ve çoğunlukla dış retina katmanı hastalıklarının tanısında kullanılan bir elektrodiagnostik testtir (Gelatt ve ark., 2013).

Retinanın fonksiyonel olarak değerlendirilmesine olanak sağlayan bu yöntem; fotoreseptörlerin ve temas ettikleri retina hücre tabakalarının, iç nükleer tabakanın ve özel bir kayıt tekniği kullanılıyorsa,

RPE'nin ışık uyarımına elektriksel bir kütle tepkisidir. Retinanın aydınlatılmasındaki kaydedilebilen elektriksel değişiklikler sırasıyla "a dalgası", onu takip eden pozitif pik "b dalgası" ve daha geç ortaya çıkıp uzun süren "c dalgası" olarak isimlendirilir (Kumar ve ark., 2018; Maggs ve ark., 2008). Veteriner oftalmolojide d ve i dalgaları sadece özel durumlarda görüntülenir (Balicka ve ark., 2016). Retinanın ışıkla uyarılmasının ardından üretilen elektriksel değişiklikler genellikle, tercihen korneaya temas eden aktif bir elektrot ve göz kapağının kenarına temas eden veya lateral kantusun en az 2 cm ya da genliği artırmak için 5 cm aboraline derialtı yerleştirilen referans (pasif) bir elektrot ile kayıt edilir (Kumar ve ark., 2018; Mentzer ve ark., 2005). Topraklama elektrodu ise kafatası üstü gibi uzak bir alana yerleştirilir. Elektroretinografi için kullanılan birçok elektrot türü bulunmaktadır. Kedi ve köpeklerde sıklıkla tercih edilen Burian-Allen veya JET elektrotları gibi kontakt lens şeklindeki kornea elektrotları güvenli, güvenilir ve kullanımı kolaydır (Kumar ve ark., 2018).

Veteriner oftalmolojide ERG; edinsel veya kalıtsal retina hastalıklarının teşhisinde, oküler ortamın oftalmoskop ile izlenemeyecek şekilde bulanık veya opak olduğu katarakt ve vitreus hemorajisi gibi durumlarda retinanın işlevselliğinin kontrolünde, retinal ganglion hücresi veya postretinal fonksiyon bozukluğu bulunan hastalarda işlev kaybının retina dışındaki yapısal bir bozukluktan kaynaklandığını ortaya koymak için kullanılmaktadır (Balicka ve ark., 2016; Nedev ve Simeonova, 2017). Elektroretinografi retinadaki spesifik hücre tiplerinin fonksiyonunu karakterize eder, oftalmoskopik ve davranışsal muayeneye göre daha objektif sonuçlar sağlar ve erken tanıya olanak verir (Kumar ve ark., 2018). Elektroretinografi, yaşlı köpeklerde ciddi görme problemleri oluşana kadar belirle-nemeyen bazı kalıtsal retinal bozuklukların belirlenmesinde kullanılarak, seçici ıslahta önemli olan genetik kusurların önlenmesine olanak sağlar (Balicka ve ark., 2016). Gelişimsel hastalıklar, geç dejeneratif/distrofik hastalıklar ve optik nöritis gibi retinopatilere sahip hastaların elektroretinogramlarının analizi retina bozukluklarının patogenezi ve veteriner oftalmolojisinde önemli olan evreleri hakkında bilgi verir (Sussadee ve ark., 2015). Ani kazanılmış retina dejenerasyonunun erken evresindeki körlükte olduğu gibi retina katmanlarında fundoskopik bozukluklar ve herhangi bir oküler bulgu izlenilmediğinde hastalığı saptamak için ERG gereklidir. Glaukomatöz optik nöropati, retinal ganglion hücrelerinin potansiyel olarak tespit edilebilir progresif kaybına neden olur; elektroretinografi, glaukoma tanısı ve değerlendirilmesinde faydalı olabilir (Balicka ve ark., 2016).

Sonuç

Veteriner hekimliğinde görme fonksiyonunun değerlendirilmesi, oftalmolojik hastalıklarda olduğu kadar sistemik hastalıkların progresyonu veya takibi açısından

dan da son derece önemlidir. Bu nedenle, oftalmolojik muayeneler sırasında fundus bir bütün olarak değerlendirilmeli ve tam anlamıyla muayene edilmelidir. Dünyada gelişen teknolojiye paralel olarak veteriner oftalmoloji alanında da durmaksızın yenilikler ortaya konulmaktadır. Böylece birçok oftalmolojik ve sistemik hastalık daha ilk safhalarında teşhis edilebilmektedir. Oküler fundusu muayene etmek için kullanılan çok sayıda direkt ve indirekt tanı yöntemi mevcut olup bu yöntemlerden bazıları kliniklerde rutin kullanırken bazıları sadece araştırmalarda kullanılmaktadır.

Kaynaklar

- Afrashi F. Optik koherens tomografi (OKT): teknik, endikasyonlar ve değerlendirme (analiz). Türkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics 2015; 8(2): 12-7.
- Balicka A, Trbolová A, Vrbovska T. Electroretinography (A review). Folia Vet 2016; 60(1): 53-8.
- Balland O, Russo A, Isard PF, Mathieson I, Semeraro F, Dulaurent T. Assessment of a smartphone-based camera for fundus imaging in animals. Vet Ophthalmol 2017; 20(1): 89-94.
- Batioğlu F. Optik koherens tomografi temel prensipler. Türkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics 2010; 3(1): 1-11.
- Bauer BS, Grahn BH, Sandmeyer LS. Diagnostic ophthalmology. Can Vet J 2016; 57: 789-90.
- Bendschneider D, Tornow RP, Horn FK, Laemmer R, Roessler CW, Juenemann AG, Kruse FE, Mardin CY. Retinal nerve fiber layer thickness in normal measured by spectral domain OCT. J Glaucoma 2010; 19 (7): 475-82.
- Byrne SF, Green RL. Ultrasound of the Eye and Orbit. Second Edition. St Louis: Mosby, 2002; p. 419-23.
- Coleman DJ, Silverman RH, Chabi A, Randeau MJ, Shung KK, Cannata J, Lincoff H. High-Resolution ultrasonic imaging of the posterior segment. Ophthalmology 2004; 111(7): 1344-51.
- Dar M, Tiwari DK, Patil DB, Parikh PV. B-scan ultrasonography of ocular abnormalities: A review of 182 dogs. IJVR 2014; 15(2-47): 122-6.
- Friberg TR, Gupta A, Yu J, Huang L, Suner I, Puliafito CA, Schwartz SD. Ultrawide angle fluorescein angiographic imaging: a comparison to conventional digital acquisition systems. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina 2008; 39(4): 304-11.
- Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. Nature biotechnology 2003; 21(11): 1361-7.
- Gelatt KN. Essentials of Veterinary Ophthalmology. Third Edition. Iowa: Wiley Blackwell, 2014; pp. 3-378.
- Gelatt KN, Gilger BJ, Kern TJ. Veterinary Ophthalmology. Fifth Edition. New Jersey: Wiley Blackwell, 2013; pp. 39-1311.
- Haddock LJ, Kim DY, Mukai S. Simple, inexpensive technique for high-quality smartphone fundus photography in human and animal eyes. J Ophthalmol 2013; (3): 1-5.
- Hewick SA, Fairhead AJ, Chaly JC, Atta HR. A comparison of 10 MHz and 20 MHz ultrasound probes in imaging the eye and orbit. Br J Ophthalmol 2004; 88(4): 551-5.
- Kanemaki N, Inaniwa M, Terakado K, Kawarai S, Ichikawa Y. Fundus photography with a smartphone in indirect ophthalmoscopy in dogs and cats. Vet Ophthalmol 2017; 20(3): 280-4.
- Kerimoğlu H. Günümüzde fundus floresin anjiografinin yeri. Ret Vit Özel Sayı 2015; 23: 15-19.
- Khanamiri HN, Nakatsuka A, El-Annan J. Smartphone fundus photography. JOVE 2017; 125: 1-5.
- Kumar D, Rai S, Chandrapuria VP, Umeel, Tekam S. Electroretinogram as a diagnostic tool in veterinary practice. JEZS 2018; 6(4): 146-8.
- Lee J, Bosen RB. Learning to read retinal OCT. Ophthalmology Management 2015; 19: 4446-8.
- Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Fourth Edition. Missouri: Saunders Elsevier, 2008; pp. 1-315.
- Martin CL. Anamnesis and the ophthalmic examination. Martin CL eds, In: Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine. London: Manson Publishing Ltd., 2005; pp. 11-38.
- Mason DR, Lamb CR, McLellan GJ. Ultrasonographic findings in 50 dogs with retrobulbar disease. J Am Anim Hosp Assoc 2001; 37(6): 557-62.
- Mentzer AE, Eifler DM, Montiani-Ferreira F, Tuntivanich N, Forcier JQ, Petersen-Jones SM. Influence of recording electrode type and reference electrode position on the canine electroretinogram. Doc Ophthalmol 2005; (111): 9-106.
- Murphy CJ, Howland HC. The optics of comparative ophthalmoscopy. Vision Res 1987; 27(4): 599-607.
- Nedev V, Simeonova G. The normal electroretinogram in adult healthy Bulgarian hound dogs. Revue Méd Vét 2017; 168(4-6): 102-7.
- Nedev VS, Simeonova GP. Normal clinical electrore-

- tinography parameters of healthy pharaoh hound-dogs. AAVS 2018; 6(2): 81-7.
- Ollivier FJ, Plummer CE, Barrie KP. Ophthalmic examination and diagnostics. Part 1: The eye examination and diagnostic procedures. Gelatt KN ed, In: Veterinary Ophthalmology. Fourth Edition. Iowa: Blackwell Publishing, 2007; pp. 438-83.
- Pennick D, Anjou MA. Atlas of Small Animal Ultrasonography. First Edition. New Jersey: Blackwell Publishing, 2008; pp. 49-90.
- Ramos de Carvalho EJ, Verbraak FD, Aalders MC, van Noorden CJ. Recent advances in ophthalmic molecular imaging. *Surv Ophthalmol* 2014; 59(4): 393-413.
- Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N, Dangel S, Tsai JY, Luhmann UF, van de Pavert SA, Wijnholds J, Samardzija M, Wenzel A, Zrenner E, Narfström K, Fahl E, Tanimoto N, Acar N, Tonagel F. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res* 2005; 45: 3512-19.
- Sharp PF, Manivannan A, Xu H, Forrester JV. The scanning laser ophthalmoscope- a review of its role in bioscience and medicine. *Phys Med Biol* 2004; 49: 1085-96.
- Smith K. Clinical examination and diseases of the fundus in dogs. *In Practice* 2014; 36: 315-33.
- Sönmez A, Arı S, Ardagil A, Candemir B, Dolar A, Mesci C, Erbil HH. Retina arter dal tıkanıklığında optik koherens tomografi bulguları. *Ret-Vit* 2008; 16: 63-7.
- Sussadee M, Phavaphutanon J, Kornkaewrat K, Thayanaphat A. Normal clinical electroretinography parameters for poodle, Labrador retriever, Thai ridgeback, and Thai Bangkaew. *J Vet Sci* 2015; 16 (1): 67-74.
- Tekin S, Yaşar T. Optik sinir başının stereofotometrik ve scanning laser oftalmoskopik karşılaştırılması. *J Clin Anal Med* 2015; 6(4): 438-42.
- Theelen T, Hoyng CB, Klevering BJ. Near-infrared subretinal imaging in choroidal neovascularization. Holtz FG, Spaide RF, eds. In: *Medical Retina: Focus on Retinal Imaging*. Heidelberg: Springer, 2010; pp. 77-91.
- Ting DS, Cheung GC, Lim LS, Yeo IY. Comparison of swept source optical coherence tomography and spectral domain optical coherence tomography in polypoidal choroidal vasculopathy. *Clin Exp Ophthalmol* 2015; 43(9): 815-9.
- Turner A. Funduscopic examination: What to look for. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, June, 2-5, 2010; Victoria-Australia.
- Zangwill LM, Weinreb RN, Berry CC, Smith AR, Dirkes KA, Coleman AL, Piltz-Seymour JR, Liebmann JM, Cioffi GA, Trick G, Brandt JD, Gordon MO, Kass MA. Racial differences in optic disc topography. Baseline results from the confocal scanning laser ophthalmoscopy ancillary study to the ocular hypertension treatment study. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 22-8.



Rahvan Koşu Atında Aortik Regürjitasyon Olgusu

İlknur KARACA BEKDİK¹, Ömer DENİZ¹, Murat VURUCU¹, Öznur ASLAN¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: İlknur KARACA BEKDİK; E-posta: ikaraca_38@hotmail.com; ORCID: 0000-0003-3897-5164

Atıf yapmak için: Karaca Bekdik İ, Deniz Ö, Vurucu M, Aslan Ö. Rahvan koşu atında aortik regürjitasyon olgusu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 187-190.

Özet: Bu olgu sunumunun amacı bir rahvan koşu atındaki aortik regürjitasyonun klinik ve ekokardiyografik olarak değerlendirilmesidir. Olgunun materyalini egzersiz sonrası hırıltılı solunum şikayeti ile ERÜ Veteriner Fakültesi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Hastanesi kliniklerine getirilen 4 yaşlı, erkek bir rahvan koşu atı oluşturdu. Atın klinik ve hematolojik muayenesinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Yapılan ekokardiyografik muayenede aort kapak bölgesinde birinci derece regürjitasyon ve aortik kapak bölgesinde regürjitant jet belirlendi.

Anahtar kelimeler: Aortik regürjitasyon, at, ekokardiyografi

Case of Aortic Regurgitation in a Amble Racehorse

Summary: The aim of the case report is evaluation of aortic regurgitation as clinical and echocardiographic in a Amble racehorse. The material of the case consisted of a 4-year-old male amble racehorse who was brought to ERU Veterinary Faculty Training, Research and Application Hospital clinics with wheezing symptoms after exercise. No pathology was detected in the clinical and hematological examination of the horse. Echocardiographic examination revealed first-degree regurgitation of the aortic valve region and aortic regurgitant jet.

Key words: Aortic regurgitation, echocardiography, horse

Giriş

Atlarda kalp kapağı yetmezlikleri en sık görülen kalp hastalıkları arasında yer almaktadır. Genellikle kalbin sol tarafındaki yüksek basınç nedeniyle mitral ve aort kapakçıkları etkilenmektedir. Aortik kapak, kapak patolojilerinin en yaygın görüldüğü bölgedir. Aortik regürjitasyon (AR) çoğunlukla nodüler veya generalize fibröz dejenerasyon ve kapak prolapsusu sonucu gelişmektedir (Reef ve Spencer, 1987). Enfektif endokardit ve konjenital malformasyonlar da AR nedenleri arasında yer almaktadır (Marr ve Bowen, 2010).

Aortik regürjitasyon, özellikle orta yaşlı ve yaşlı atlarda sık görülmekle birlikte (Reef ve ark., 2014) performans atlarında karşılaşılabilecek en yaygın valvüler regürjitasyon türüdür (Reef ve Spencer, 1987). Yarış atlarında görülme oranının %65'e vardığı bildirilmiştir (Young ve ark., 2008). Aortik regürjitasyonlu atlar genellikle normal performans seviyesine ve yaşam beklentisine sahiptir, ancak bazı atlarda durumun ilerlemesi daha hızlıdır (Stevens ve ark., 2009). Regürjitant akışı arttıkça sol ventrikül diyastolik basıncı artar ve kompensatorik eksantrik hipertrofiye yol açabilir (Afonso ve ark., 2011). Artan ön yük ve sol ventrikül kasılma fonksiyonu, artmış vuruş hacmi ve aort kökü dilatasyonu ile sonuçlanır (Reef ve Spencer,

1987). Aortik regürjitasyon şiddeti artıp, sol ventrikülün yeniden yapılanma sınırları aşıldığında, kalp normal işlevini sürdüremez. Sonuçta egzersiz intoleransı, dispne ve ventriküler aritmi gibi klinik belirtiler belirgin hale gelebilir (Marr ve Bowen, 2010). Orta veya şiddetli AR'li atlarda ventriküler aritmi, kollaps ve ani ölüm riski yüksektir (Reef ve ark., 2014).

AR'li atlarda yüksek dereceli diyastolik üfürümler, çoklu kalp üfürümleri ve hiperkinetik nabız saptanabilir. Aortik regürjitasyonun ciddiyeti için en iyi klinik bulgu üfürümün derecesinden ziyade arteriyel nabızın kalitesidir. Ayrıca, hastalığın ciddiyeti için yararlı bir rehber olan invaziv olmayan arteriyel basıncı ölçmek de faydalı olabilir. Şiddetli AR'li atların diyastolik arter basıncı 50 mmHg'nin altında ve hafif AR'li atlara kıyasla (sistolik-diyastolik) 60 mmHg'dan daha büyüktür. Yetersizliğin şiddeti arttıkça, istirahat halindeki kalp hızında artış da gözlenebilir (Marr ve Bowen, 2010).

Aortik regürjitasyon üfürümü tipik olarak pan, holo veya erken diyastolik, 1-6/6 derece aralığında ve genellikle dekrescendo şeklindedir (Reef ve ark., 1995). Bu üfürümler aort kapak bölgesinde en yüksektir ve kalbin apeksine doğru yayılır (Reef ve ark., 1988; Bonagura, 1990). Sol taraflı valvüler regürjitasyon üfürümleri olan atlar, bu üfürümleri olmayanlarla benzer bir yaşam süresine sahiptir (Stevens ve ark., 2009). Orta yaşlı atlarda, AR genellikle iyi tolere edilebilmektedir. Şiddetli aortik yetmezlik ve şiddetli,

Geliş Tarihi/Submission Date : 05.11.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 04.02.2020

ilerlemiş dejeneratif hastalık, özellikle sol ventrikül dilatasyonu mitral kapak anülüsünün dilatasyonuna ve mitral regürjitasyon (MR)'a neden olmuşsa veya belirgin ventriküler ektopi varsa, prognoz kötüdür (Marr ve Bowen, 2010).

Aortik regürjitasyonda kaçak alanı, yönü ve süresi renkli Doppler ile saptanabilmektedir (Young ve ark., 2008). Aorta tespit edilen ters diyastolik akımla birlikte, mitral kapağın septal yaprağının ötesine uzanan, sol ventrikül çıkış yolunun 2/3'ünden daha büyük bir regurgitant jet şiddetli aort yetersizliği ile uyumludur (Reef, 1995). Ayrıca ekokardiyografide, aort kökünde dilatasyon ile koroner olmayan ucun prolapsusu yaygın bulgular olmakla birlikte, nadiren ciddi yetersizlik ile ilişkilendirilir. Yaşlı atlarda görülen tipik dejeneratif hastalıkta, dejeneratif nodülleri temsil eden ekojenik odaklar genellikle sol koroner uca yerleşir. Aort kapağının generalize kalınlaşması ve zedelenmiş uç komplike bir patolojiyi gösterir. Orta ila şiddetli AR sol ventriküler hacmin aşırı yüklemesi, sol ventriküler boşluk dilatasyonu ve interventriküler septum ve sol ventrikül serbest duvarının incelmeleri ile sonuçlanır. Orta ve şiddetli AR bulunan atlarda mitral kapağın erken kapanması da ekokardiyografide belirlenen diğer bir bulgudur (Reef ve Spencer, 1987).

Olgu

Tablo 1. Hematolojik değerler

Parametre	Sonuç	Parametre	Sonuç
WBC ($10^9/L$)	10.9	HCT (%)	42.6
Lenf.# ($10^9/L$)	4.0	MCV (fL)	47.9
Mon.# ($10^9/L$)	0.4	MCH (pg)	15.3
Gran.# ($10^9/L$)	6.5	MCHC (g/dl)	32.1
Lenf. (%)	36.9	RDW (%)	18.7
Mon. (%)	3.4	PLT ($10^9/L$)	170
Gran. (%)	59.7	MPV (fL)	4.8
RBC ($10^{12}/L$)	8.90	PDW	15.8
HGB (g/dl)	13.7	PCT (%)	0.081

Tablo 2. Göğsün sağ tarafından alınan sol ventrikülün M-mod ve iki boyutlu yöntemlerle elde edilen ekokardiyografi bulguları

Parametreler	Sağdan sol ventrikül
IVS _d (cm)	2.17
LVIDd (cm)	8.23
LVPWd (cm)	3.20
IVSs (cm)	4.11
EF (%)	%82.98
FS (%)	%41.67
LVIDs (cm)	4.88
LVPWs (cm)	4.11

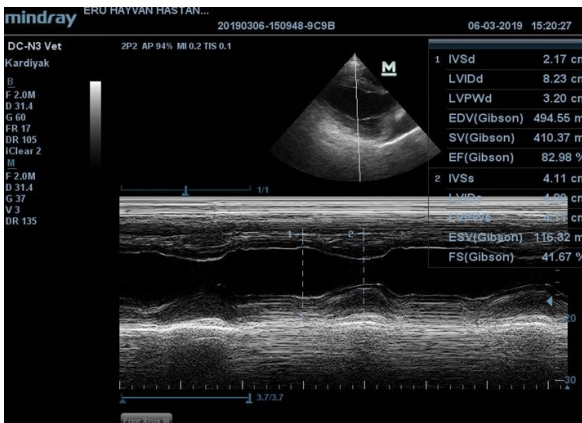
IVS_d: Diastalde interventriküler septum kalınlığı, LVIDd: Diastalde sol ventrikül çapı, LVPWd: Diyastolde sol ventrikül serbest duvarı kalınlığı; IVS_s: Sistolde interventriküler septum kalınlığı; EF: Ejeksiyon fraksiyonu; FS: Fraksiyonel kısalma, LVIDs: Sistolde sol ventrikül çapı, LVPWs: Sistolde sol ventrikül serbest duvarı

Olgunun materyalini egzersiz sonrası hırıltılı solunum şikayeti ile ERÜ Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen 4 yaşlı, erkek, yaklaşık olarak 350 kg ağırlığında bir rahvan koşu atı oluşturdu. Alınan anamnezde atın son iki antrenmandan sonra hırıltılı solunum yaptığı ve 2 yaşında göğüs kafesine almış olduğu darbe sonucu pectoral kaslarda, şişlik meydana geldiği ve zaman içinde kendiliğinden iyileştiği bilgisi alındı.

Yapılan klinik muayenede rektal vücut sıcaklığı 37.8 °C, nabız 36/dk, solunum sayısı 16/dk olarak belirlendi. Atın hematolojik değerleri normal sınırlar içerisindeydi (Tablo 1). Akciğer ve kalbin oskültasyonunda herhangi bir patolojik sese rastlanmadı. İki boyutlu ve M-mod ekokardiyografi yöntemi ile apikal 4 ve 5. kostalar arası boşluktan, parasternal uzun eksen görüntüsü ile yapılan incelemede, sağ atriyum, triküspital kapak, sağ ventrikül, pulmoner kapak, pulmoner arter ve aortik kök görüntülendi.

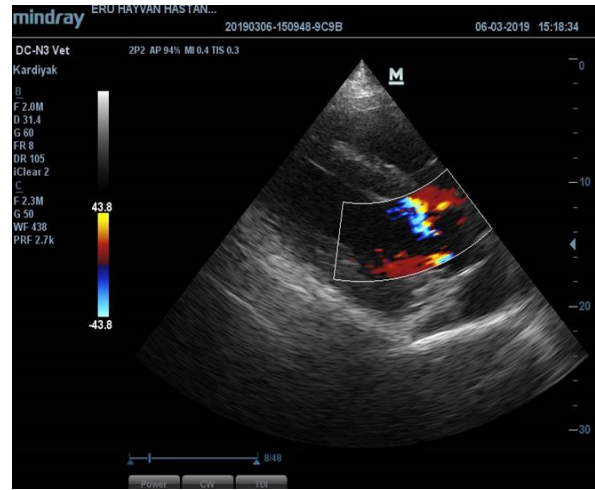
Ekokardiyografik muayene için atın sakin durabileceği bir ortam seçildi. Atın aksillar bölgesinden transuderin açısı ve orientasyonu uygun bir şekilde ayarlanarak, muayenelere sağ parasternal pencere ile başlandı. Prob sağ parasternal görüntüler elde etmek amacıyla 3 ile 5. intercostal aralıktan olekranonun 5-7.5 cm dorsalinde göğüs kafesine dik olacak şekilde

yerleştirildi. Gerekli açılımlar yapılarak sağ parasternal uzun eksen dört odacık ve sağ parasternal uzun eksen sol ventrikül çıkışı görüntüleri elde edildi. 2-D ekokardiyografi (Mindray DC-N3 Vet, Çin, 2.0-4.0 MHZ kardiyak prob) ile kalp 2 boyutlu olarak incelendi. Mitral ve triküspital kapak hareketleri gözlemlendi. Prob saat yönünün tersine çevrilerek sağ parasternal kısa eksen görüntüleri elde edildi. Farklı açılımlarla ile musculus papillaris, chorda tendinealar, aort ve sağ ventrikül çıkışı incelendi. Mitral ve triküspital kapak yapısı ve hareketleri ile ilgili olağan dışı bir bulgu gözlemlenmedi. Musculus papillaris ve chorda tendinealarda anormallik gözlemlenmedi. Transduser 0 ile 90 °lik açılarda pozisyon verip, M-mod kursörünün kullanılmasıyla, M-mod görüntüsünde ekokardiyografik ölçümler yapıldı. M-mod tekniği ile interventriküler septumun diastol sonu kalınlığı (IVSd), interventriküler septumun sistol sonu kalınlığı (IVSs), sol ventrikülün diastol sonu iç çapı (LVIDd), sol ventrikül sistol sonu iç çapı (LVIDs), sol ventrikül yüzde kasılma gücü (% FS), sol ventrikül yüzde fırlatma gücü (%EF) ölçüldü (Tablo 2). Bulunan değerler normal sınırlar içindeydi (Şekil 1).



Şekil 1. Sağ parasternal uzun eksen sol ventrikül M-mod ve iki boyutlu görüntü

Sağ parasternal pozisyonundan 2-D ekokardiyografi tekniğiyle birlikte renkli doppler tekniği kullanılarak mitral kapak, triküspital kapak ve aortik kapak hizasından kan akımları incelendi. İnterventriküler ve atri-ventriküler septumlar, septal defekt açısından incelendi. Herhangi bir anormalliğe rastlanmadı. Mitral ve triküspital kapak hizasından yapılan renkli doppler incelemesi sonucunda normal kan akım profilleri gözlemlendi. Sol ventrikül çıkışı alanının renkli doppler muayenesinde özellikle ventriküllerin gevşemesi sırasında belirgin aortik regürjitasyon tespit edildi. Yapılan renkli doppler muayenesinde aortik kapak bölgesinde regürjitant jet belirlendi (Şekil 2). Belirlenen aortik regürjitasyonun hafif şiddette olması ve hafif şiddette AR bulunan atlarda medikal tedavi önerilmemesi nedeniyle hastanın takip edilmesi tavsiye edildi.



Şekil 2. Aortik regürjitasyon

Tartışma ve Sonuç

Aortik kapak, kapak patolojilerinin en yaygın görüldüğü bölgedir. AR çoğunlukla nodüler veya generalize fibröz dejenerasyon ve kapak prolapsusu sonucu gelişmektedir (Reef ve Spencer, 1987). Enfektif endokardit ve konjenital malformasyonlar da AR nedenleri arasında yer almaktadır (Marr ve Bowen, 2010). Sunulan vakada yapılan klinik ve ekokardiyografik muayeneler sonucunda aort bölgesinde nodül, fibröz dejenerasyon, enfektif endokardit ya da herhangi bir konjenital defekte rastlanmadı.

Aortik kapak yetmezlikleri orta ve daha yaşlı hayvanlarda görülmekte olup çoğunlukla ileri yaşlara kadar görülmemektedir (Reef ve Spencer, 1987). AR'li atlar genellikle normal performans seviyesine ve yaşam beklentisine sahiptir, ancak bazı atlarda durumun ilerlemesi daha hızlıdır (Stevens ve ark., 2009; Reef ve ark., 2004). Regürjitant akışı arttıkça sol ventrikül diyastolik basıncı artar ve kompensatorik eksantrik hipertrofiye yol açabilir (Afonso ve ark., 2011). Artan ön yük ve sol ventrikül kasılma fonksiyonu, artmış vuruş hacmi ve aort kökü dilatasyonu ile sonuçlanır (Reef ve Spencer, 1987). AR şiddeti daha da artarsa ve sol ventrikül yeniden yapılanma sınırlarını aşarsa, kalp normal işlevini sürdürmez ve egzersiz intoleransı, dispne ve ventriküler aritmi gibi klinik belirtiler belirgin hale gelebilir (Marr ve Bowen, 2010). Orta veya şiddetli AR'li atlarda ventriküler aritmi, kollaps ve ani ölüm riski yüksektir (Reef ve ark., 2014). Sunulan vakada atın yaşının 4 olması, birinci derece aortik regürjitasyon dışında yapılan kalple ilgili diğer klinik ve ekokardiyografik bulguların normal olması nedeniyle aortik kapak yetmezliğinin erken safhalarında olduğu düşünüldü ve takip önerildi.

Ekokardiyografi atlarda, kalbin yapısı, boyutu, fonksiyonları ve hastalık varsa hastalığın şiddeti hakkında bilgi sağlayan bir muayene yöntemidir (Chope, 2018).

Ayrıca, vejetatif endokarditis, perikarditis, kapak yetersizlikleri ve ventriküler septal defekt gibi pekçok anormal durumun değerlendirilmesinde, noninvaziv bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Bonagura, 1985). Ekokardiyografik muayene için kullanılan M-mod, renkli Doppler, "pulsed wave" Doppler ve "continuous wave" Doppler yöntemleri birbirini tamamlayan veriler sağlamaktadır (Chope, 2018). Sunulan olguda da 2-D ekokardiografi, M-mod ölçümleri ve renkli doppler kullanılarak aortik regürjitasyon olduğu belirlendi.

Osültasyon kardiovasküler sistemin muayenesinde en temel muayene yöntemidir. Tanı üfürümünün yeri, şiddeti, karakteri (kalitesi), zamanı ve yayılımına bağlıdır. Nabız kalitesi ve perifer ödem olup olmaması gibi bilgiler, anamnezde performans bilgileri ile elektrokardiografik ve ekokardiyografik muayene kardiyak üfürümün kaynağının belirlenmesi için yardımcı diğer yöntemlerdir (Chope, 2018; Patteson ve Cripps, 1993). Aortik regürjitasyon üfürümü tipik olarak pan, holo veya erken diyastolik, 1-6/6 derece aralığında ve genellikle dekrescendo veya müzikaldir (Reef, 1995). Bu üfürümler aort kapak bölgesinde en yüksektir ve kalbin apeksine doğru yayılır (Reef ve ark., 1988; Bonagura, 1990). Ancak Patteson ve Cripps (1993) yaptıkları çalışmada Doppler ekokardiyografi ile 2 atta triküspidal regürjitasyon ve mitral regürjitasyon belirlemelerine rağmen kalbin sağ tarafından pansistolik ya da holosistolik üfürüm duymadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan vakada da üfürüm duyulmamasının sebebinin aortik regürjitasyonun derecesine bağlı olduğu düşünüldü.

Sonuç olarak, sunulan çalışma ile 4 yaşlı, erkek bir rahvan koşu atının kalbi ekokardiyografik yöntem ile değerlendirildi ve aortik regürjitasyon belirlendi. Egzersiz sonrası hırıltılı solunum dışında herhangi bir klinik belirti göstermeyen atlarda, bu olguda olduğu gibi kalple ilgili patolojilerin de göz ardı edilmemesi gerektiği kanaatine varıldı.

Kaynaklar

- Afonso T, Verheyen T, Saey V, Sys SU, van Loon G. Severe aortic regurgitation due to endocarditis in a horse. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 2011; 80(1): 49-54.
- Bonagura JD. Clinical evaluation and management of heart disease. *Equine Vet Educ* 1990; 2(1): 31-7.
- Bonagura JD. Equine heart disease. An overview. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1985;1(2): 267-74.
- Chope KB. Cardiac/cardiovascular conditions affecting sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2018; 34(2): 409-25.
- Marr CM, Bowen M. *Cardiology of the Horse*, Second Edition. St. Louis USA: Saunders Elsevier, 2010; pp. 208-12.

- Patteson MW, Cripps PJ. A survey of cardiac auscultatory findings in horses. *Equine Vet J* 1993; 25(5): 409-15
- Reef VB, Bonagura J, Buhl R, McGurrian MK, Schwarzwald CC, van Loon G, Young LE. Recommendations for management of equine athletes with cardiovascular abnormalities. *J Vet Intern Med* 2014; 28(3): 749-61.
- Reef VB, Levitan CW, Spencer PA. Factors affecting prognosis and conversion in equine atrial fibrillation. *J Vet Intern Med* 1988; 2(1): 1-6.
- Reef VB, Spencer P. Echocardiographic evaluation of equine aortic insufficiency. *Am J Vet Res* 1987; 48(6): 904-9.
- Reef VB, Whittier M, Griswold Allam L. Echocardiography. *Clin Tech Equine Pract* 2004; 3(3): 274-83.
- Reef VB. Heart murmurs in horses: Determining their significance with echocardiography. *Equine Vet J Suppl* 1995; 19: 71-80.
- Stevens KB, Marr CM, Horn JN, Pfeiffer DU, Perkins JD, Bowen IM, Allan EJ, Campbell J, Elliott J. Effect of left-sided valvular regurgitation on mortality and causes of death among a population of middle-aged and older horses. *Vet Rec* 2009; 164(1): 6-10.
- Young LE, Rogers K, Wood JL. Heart murmurs and valvular regurgitation in thoroughbred racehorses: epidemiology and associations with athletic performance. *J Vet Intern Med* 2008; 22(2): 418-26.

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlamalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayımlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
14. Ondalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. Kaynaklar metin içinde cümle sonunda belirtilmelidir. Yazar soy isimleri ve tarihi yazı içinde her kaynağa ait yayın yılı yazar isminden hemen sonra parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak iki isimli ise isimler belirtilmeli (örn; Kaldhone ve Nayak, 2008). Kaynakta yazar sayısı ikiden fazla ise sorumlu yazar "ve ark." şeklinde belirtilmelidir (örn, Kaldhone ve ark., 2008). Eğer kaynak cümlenin başında kullanılıyorsa yazar isimlerinden sonra parantez içinde yayın yılı belirtilmelidir.
19. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, kaynaklar bölümünde 0.5 cm içeri doğru asılı halde yazılmalıdır. Noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**
Kaynaklar;
19.1. Kaynak süreli yayın ise;
Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;
Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Krusibeek AM, Marguiles DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
19.3. Kaynak kitap ise;
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
19.4. Kaynak editörlü kitap ise;
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafkl KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;
Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
19.6. Kaynak tez ise;
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;
Örnek: TÜİK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references.,
4. Manuscripts should be sent to ercvet@gmail.com. For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 words) with no paragraph and not more than five Key words in Turkish and English. Key words must be placed below summary with an alphabetical order (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be specified in the text at the end of the sentence. Author surnames and the date of publication should be specified in parentheses. If the reference has two names, the names should be given after the publication year (eg, Kaldhone and Nayak, 2008). If the reference has more than two names should be given as "et al.," (eg, Kaldhone et al., 2008). If the source is used at the beginning of the sentence, the year of publication should be specified in parentheses after the names of the authors.
19. References should be placed in alphabetical order and hanging 0.5 cm inwards in the references section. Punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.** References;
 - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;
Example: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaidd DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
 - 19.2. If the reference is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below;
Example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 19.3. If the reference is a book, citation must be done as shown below;
Example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 19.4. If the reference is whole book with an editor, citation must be as below;
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. If the reference is from meeting, citation must be done as shown below;
Example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; Izmir-Türkiye.
 - 19.6. If the reference is from a thesis, citation must be done as shown below;
Example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, Izmir-Turkey, 1993.
 - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tujk.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.