

JOURNAL OF ADVANCES IN
VETBIO SCIENCE AND TECHNIQUES



E-ISSN: 2548 - 1150 - Period: Tri-annual



J Adv VetBio Sci Tech - Volume 6(1) - April 2021



Year 2021

Volume 6

Issue 1

EDITORIAL ARCHIVE

Editors-in-Chiefs

Hikmet ÜN, University of Aksaray (ASU)
İlker CAMKERTEN, University of Aksaray

Associate Editors

Caner ÖZTÜRK, University of Aksaray

Section Editors

Duygu BAKI ACAR, Uni. of Afyon Kocatepe, Clinical Sciences
Erdoğan UZLU, University of Balıkesir, Wildlife Sciences
Suat DIKEL, University of Çukurova, Fisheries
Tuğçe KARADUMAN, University of Aksaray, Biology

Editorial Board

Abuzer ACAR, University of Afyon Kocatepe, Türkiye
Bestami YILMAZ, University of Harran, Türkiye
Halil SELÇUKBİRİCİK, University of Afyon Kocatepe, Türkiye
Hesham A.El ENSHASY, Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia
Iliia TSHACEV, University of Stara zagora, Bulgaria
Katarzyna ŻARCZYŃSKA, University of Warmia-Mazury, Poland
Koycho KOEV, University of Stara zagora, Bulgaria
Mehmet AVCI, University of Harran, Şanlıurfa, Türkiye
Mehmet ÇABALAR, University of Harran, Türkiye
Muhammed KATICA, Uni. of Srajevo, Bosnia&Herzegovina
Otilia BOBİS, University of Agricultural Sciences and Veterinary
Medicine of Cluj-Napoca, Romania
Özcan EREL, Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Türkiye
Przemysław SOBIECH, University of Warmia-Mazury, Poland
Tevhide SEL, University of Ankara, Türkiye
Zbigniew ADAMIAK, University of Warmia-Mazury, Poland

Names are listed alphabetically

April 30, 2020 / Copyright© VetBio

DergiPark
AKADEMİK

Journal of Advances in VetBio Science and Techniques is aimed to serve as scientific research journal.

VetBio is a triannual (April, August, and December), open access, and fully refereed international journal.

VetBio is to publish high-quality scientific research articles on animal-related fields including science branches such as veterinary medicine, fisheries, biological sciences, food science, wildlife and zoology. In addition, short communications and reports, case reports, letter to the editor and reviews are also accepted. Publishing languages are Turkish and English. The editorial policy of the journal is based on independent, unbiased, and double-blind peer-review. The VetBio does not charge submission, processing or publication fee.

VetBio has been indexed by TRDizin, CAB International (CABI) index, Index Copernicus International (ICI) World of Journals, Google Scholar, Academic Research Index (Research Bib), Root Society for Indexing and Impact Factor Service (Rootindexing), Eurasian Scientific Journal Index (ESJI), Cosmos Impact Factor, Scientific Indexing Services (SIS), OpenAIRE, Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), and CiteFactor databases.

e-mail: vetbiojournal@gmail.com

Web Page: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>

Phone: 05536203468

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



CONTENTS

	Pages
Research Articles	
Estivasyon döneminde farklı kabuk renklerinin <i>Helix lucorum</i> Linneaus, 1758 (Gastropoda: Helicidae) Üzerine Etkisi 👤 Hülya ŞEREFLİŞAN	1-8
Effects of Pennyroyal (<i>Mentha pulegium</i> L.) on Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) and Antioxidant Parameters in Rabbits 👤 Mustafa MAKAV, Mükremin ÖLMEZ	9-14
Diagnosis of pulmonary aspergillosis in geese by histopathological and microbiological methods 👤 Emin KARAKURT, Fatih BÜYÜK, Serpil DAĞ, Enver BEYTUT, Özgür ÇELEBİ, Doğan AKÇA, Hilmi NUHOĞLU, Ayfer YILDIZ, Emre KURTBAŞ	15-21
Koç spermasının kısa süreli saklanması katkı maddelerinin etkisi 👤 Caner ÖZTÜRK, Şükrü DURSUN, Gaye BULUT, Tahir KARAŞAHİN	22-28
Analysis of E-coded food additives in delicatessen product labels within the status of Halal food 👤 Serap KILIÇ ALTUN, Mehmet Emin AYDEMİR	29-34
Case Reports	
Bir kedide fasiyal leomiyosarkom olgusu 👤 Ali HAYAT, Kerem YENER, Ünal YAVUZ, Nihat YUMUŞAK	35-38
Sistemik inflamatuvar cevap sendromu ve muhtemel bakteriyel translokasyonu mevcut köpeklerde vital destekleyici yeni sağaltım: proktolizis ile yüksek hacimde polietilen glikol uygulaması 👤 Kerem URAL, Hasan ERDOĞAN, Songül ERDOĞAN, Şükran Gözde İÇAÇAN, Cansu AKBAŞ	39-44
Review Article	
Western Blot 👤 Hatice Pelin ASLIM, Oya BULUT	45-56

Estivasyon döneminde farklı kabuk renklerinin *Helix lucorum* Linneaus, 1758 (Gastropoda: Helicidae) Üzerine Etkisi

The effect of different shell colors on *helix lucorum* (Gastropoda: Helicidae) in estivation period

ÖZET

Bu çalışmada, Türk salyangozu (*Helix lucorum* Linneaus, 1758) için sıcaklık değerlerinin kritik sınırlarda olduğu estivasyon (yaz uykusu) döneminde, beyaz ve siyah kabuk renginin canlı ağırlığa olan etkisi araştırılmıştır. *Helix lucorum*'un kabukları estivasyon başlangıcında siyah ve beyaza boyanarak, biri kontrol grubu olmak üzere beyaz boyalı, siyah boyalı ve doğal rengine olan üç tekerrürlü üç grup oluşturulmuştur. Her grup için 20 adet salyangoz planlanmış ve toplamda 180 adet *H. lucorum* kullanılmıştır. Estivasyon döneminde hipometabolizmik davranış Prosedürü; estivasyona giriş, estivasyon dönemi ve estivasyondan çıkış olmak üzere üç aşamada değerlendirilmiştir. Estivasyon döneminde siyah renge boyalı salyangozların çoğunluğu toprak alanı, beyaz renkte olanlar penin cam yüzeyinde ve kontrol grubundakiler toprak alan ve cam yüzeyde sabitlenmeyi tercih etmişlerdir. Estivasyon dönemi sonunda siyah boyalı grup %40 oranında 1.gün yaz uykusundan uyanmıştır. Bu süreci 4.günde %100 uyanışla siyah boyalı grup tamamlamıştır. Beyaz renge boyalı grup 10.günde, kontrol grubu ise 5.günde tamamen uyanmıştır. Estivasyon çıkışında en yüksek yaşama oranı beyaz boyalı grupta (%98) tespit edilmiştir. Siyah renge boyanan salyangozların üç aylık estivasyon sürecinde, bireylerin aktivasyon öncesi ve sonrası ağırlık ölçüm değerlerinde istatistiki olarak çok önemli farklılıklar ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Estivasyon başlangıç ve bitiş kabuk ölçüm değerleri karşılaştırıldığında (yükseklik ve genişlik) istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. Siyah renge boyanan bireylerin canlı ağırlık kaybı estivasyon dönemi sonunda %24,59 oranında tespit edilmiştir. Estivasyon sürecinde beyaz rengin, siyah boyalı renge ve boyalı olmayan kontrol grubuna göre avantajlı bir oranda (%6,18) olduğu belirlenmiştir. Estivasyon sürecinde yüksek ısı emiliminin koyu renkli kabukta daha fazla olması nedeniyle, açık rengin bu kara salyangozu için avantajlı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, salyangoz yetiştiriciliğinde spesifik büyüme açısından oldukça önemli olup, salyangoz kültür yöntemlerinin oluşturulmasına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Ağırlık Kazancı, estivasyon, *H.lucorum*, Türk salyangozu, sıcaklık

ABSTRACT

In the study, the effect of white and black shell color on Turkish snail (*Helix lucorum*) was investigated in the estivation period. The shells of *Helix lucorum* were painted in black and white at the beginning of estivation. Three groups of three replicates were created; white group, black group and control group. 20 snails were planned for each group and 180 *H. lucorum* were used in total. Hypometabolic behavior procedure during estivation period was evaluated in three stages as entrance to estivation, estivation period and exit from estivation. The majority of snails painted in black during the estivation period chosed soil. The white ones collected on the glass surface of the pen (aquarium). Snails in the control group were fixed both in the soil area and on the glass surface. At the end of the estimation period, 40% of the black-painted group woke up from summer sleep on the first day. The black painted group exited 100% estivation on the fourth day. The group painted in white woke up on the tenth day and the control group completely on the fifth day. At the exit of estivation the highest survival rate was found in the white-painted group (98%). Statistically significant differences ($p<0,05$) were determined in the weight measurement values of snails painted in black color before and after estivation.

Keywords: Weight gain, Estivation, *H. lucorum*, Turkish snail, temperature

How to cite this article

Şereflişan, H. (2021). Estivasyon döneminde farklı kabuk renklerinin *Helix lucorum* Linneaus, 1758 (Gastropoda: Helicidae) Üzerine Etkisi. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.31797/vetbio.801902>

Research Article

Hülya ŞEREFLİŞAN^{1a}

¹Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences and Technology, Iskenderun Technical University, Iskenderun, Turkey

ORCID-

[0000-0002-2510-3714](https://orcid.org/0000-0002-2510-3714)

Correspondence

Hülya ŞEREFLİŞAN

hulya.sereflisan@iste.edu.tr

Article info

Submission: 29-09-2020

Accepted: 15-01-2021

Online First: 22-03-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



No statistical difference was found when the estivation start and end shell measurement values (height and width) were compared. At the end of the estivation period, the body weight loss of individuals dyed in black was 24,59%. The white group was found to be more advantageous (6,18%) than other groups. It was determined that light color is advantageous for this land snail due to higher heat absorption in the dark crust during the estivation period. This study is very important in terms of specific growth in land snail breeding and will shed light on the creation of land snail culture methods.

GİRİŞ

Hayvanlar aleminin en büyük ikinci şubesi olan Mollusca (yumuşakçalar) şubesinin Gastropoda (karındanbacaklılar) sınıfında yer alan kara salyangozları (Adeyeye & Afolabi, 2004; Akman vd., 2005), kritik sıcaklık sınırlarında, hava şartları ile başa çıkmak için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal açıdan adaptasyon geliştirmişlerdir (Umezurike ve Iheanacho, 1983; Pedler vd., 1996; Storey, 2002). Bunlardan biriside kabuk rengi olarak ön plana çıkmaktadır. Canlıların dış yüzey rengi, yaşamlarını sürdürmede önemli rolü olan bir olgudur. Renklenme, vücut yüzeyini kaplayan tabaka tarafından absorbe edilen enerjiyi etkileyerek oluşmaktadır. Renk koyulaştıkça absorbe edilen enerji miktarı da yükselmektedir. En dıştaki yüzey tabakasının rengi, yansıtılan dalga boylarına bağlıdır. Bir canlı yüzey rengini predatörlere karşı koruyucu anlamda kullanırken, diğer canlılarla iletişimde de kullanabilmektedir (Badyaev & Hill, 2000; They vd., 2005; Exnerova vd., 2006). Kurak bölgelerde yaşayan hayvanlar için renk oldukça önemlidir (Cloudsley-Thompson, 1978). Sıcaklık seviyesinin kritik sınırlarda olduğu durumlarda karasal yumuşakçaların, dehidrasyona karşı oldukça hassas oldukları bildirilmektedir (Prior, 1985; Luchtel ve Deyrup-Olsen, 2001). Çok yüksek veya düşük sıcaklıklarda salyangozlar hayatta kalmak için bazı adaptasyonlar göstermektedir. Özellikle dış kabuk renginin beyaz olması, kara salyangozlarının sıcak ortamlardaki başarısını artırabilir bir unsur olarak görülmektedir. Beyaz renkli kabukların yüksek sıcaklıklarda güneş ışığını geri yansıtarak, kabuk içine girişinde daha az absorbe edilişi, vücut suyunun daha az kaybedilmesine neden olmaktadır. Kabuk rengi açık olan salyangozlar daha düşük vücut

sıcaklığı kaydettikleri için yüksek sıcaklıkta hayatta kalma oranlarını artırabilmektedirler (Schmidt-Nielsen vd., 1971; Heath, 1975; Richardson, 1974). Vücut ağırlığının yaklaşık %80-90'ı su olan salyangozların, vücut ağırlıklarındaki azalma, su kaybının olduğunu göstermektedir (Schmidt-Nielsen vd., 1971; Yom-Tov, 1971; Steinberger vd., 1981). Kara salyangozlarının fizyolojisindeki değişimler üzerine su, sıcaklık ve nemin etkili olduğu, bunun sonucunda davranışsal bazı değişimlerin söz konusu olduğu bildirilmektedir (Prior, 1985; Cook, 2001; Storey, 2002; Giokas, vd., 2007). Bu anlamda türe özgü habitat gereksinimlerinin tespit edilmesi, salyangozların gelecekte değişen çevresel şartlarda tepkilerinin tahmin edilmesinde kullanılabilir (Storey, 2002). Beyaz kabuk rengine sahip olan *Sphincterochila* cinsi salyangozlar, renk avantajından dolayı en bol bulunan gastropodlardır (Moreno-Rueda, 2002). Bu tür salyangozlar, kurak ortamlarda özel sığınaklar aramadan estivasyon sürecini rahatlıkla geçirebilmektedirler (Steinberger vd., 1983; Arad vd., 1989; Cook, 2001; Moreno-Rueda, 2007; Moreno & Collantes-Martin, 2007; Moreno-Rueda, 2008). Bu çalışmada, kabuk rengi koyu olan *Helix* cinsi kara salyangozlarının, kurak dönemlerde vücut ağırlık kaybının giderilmesinde yeni bir yöntem oluşumu araştırılarak, salyangoz yetiştiriciliğinde estivasyon sürecine katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Canlı materyal temini

Bu çalışma da kullanılan salyangozlar (*H. lucorum*) Mayıs 2018 yılında, Hatay'ın İskenderun ilçesinin yüksek dağlık bölgesinden toplanarak (180 adet), araştırma yeri olan İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi'ne getirilmiştir. *H. lucorum* Schütt (1993)'e göre teşhis edilmiştir.

Araştırma prosedürü

Toplanan salyangozlara iki gün yem verilmemiş, 3. günden itibaren marul ile yarı açık bir alanda bir hafta yemleme yapılarak ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Araştırma öncesi, salyangozların bir bölümü beyaza, diğer bölümü siyah renge boyanmıştır. Böylece, Beyaz Boyalı (BB), Siyah Boyalı (SB) ve doğal renginde olmak üzere (K), biri kontrol üçer tekerrürlü üç grup ile araştırma yapılmıştır. Salyangozlar 50x50x5 cm büyüklüğündeki 9 adet pene 20'şer adet olacak şekilde

yerleştirilmiştir. Cam materyalden yapılmış olan pen içine 20 cm yüksekliğinde humuslu toprak konulmuştur. Salyangozlar, Haziran ortası estivasyona girmiş, Eylül sonu estivasyon sürecini tamamlamışlardır. Salyangozların Estivasyon Öncesi (EÖ) ve Sonrası (ES) canlı ağırlık ölçümü için 0,1 g hassasiyetli dijital terazi, yükseklik ve genişlik ölçümü için dijital kumpas (0,01 mm) kullanılmıştır. Salyangozlar estivasyona giriş sürecine kadar marul ile beslenmiş, bu adaptasyon süresince penlerdeki toprak spreyleme yöntemi ile nemlendirilmiştir.



Şekil 1. Estivasyon sürecinin başlangıcında salyangozlar (*H. lucorum*); (A)beyaz boyalı, (B)siyah boyalı ve (C)kontrol grubu.

Hipometabolizmik davranış prosedürü

Salyangozların estivasyon dönemi; estivasyona giriş, estivasyon dönemi ve estivasyondan çıkış olmak üzere üç aşamada değerlendirilmiştir. Salyangoz türlerinin hipometabolizmik davranışları; pendeki hareketlilik durumlarına, pen içinde hareketli oldukları bölgelere ve sabitlenerek estivasyonu geçirdikleri alana göre değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel hesaplamalarda SPSS paket programı kullanılmıştır. Karşılaştırmalar yapılamadan önce varyansların homojenliği test edilmiştir. estivasyon öncesi ve sonrası ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında t-testi (Eşleme metodu-paired t test), siyah, beyaz renge boyanmış bireyler ve kontrol grubundaki bireylerin

estivasyon sonrası ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) ve Duncan Testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Salyangozların bulunduğu penler yarı kapalı bir ortamda bulunduğu için estivasyon sürecine girdikleri aydan itibaren (Haziran 2018), sıcaklık, nem ve yağış verileri günlük ölçümlenerek, aylık ortalama değerleri belirlenmiştir. En yüksek sıcaklık ve en düşük yağış Ağustos ayında görülürken, en yüksek nem oranı Temmuz ayında, en yüksek yağış Haziran ayında tespit edilmiştir (Tablo 1).

Estivasyon döneminde farklı kabuk renklerinin etkisi

Tablo 1. Estivasyona giriş ve çıkış süresince sıcaklık, nem ve yağış değerleri

Günlük	Haziran	Temmuz	Ağustos	S.H*
Maksimum sıcaklık (°C)	35,4	37,5	39	0,21
Minimum sıcaklık (°C)	25	29	33,8	0,15
Ortalama günlük sıcaklık (°C)	32,36	31,03	36,02	0,33
Nem (%)	60	65	64	0,22
Günlük yağış (mm)	7,1	1,1	0,0	0,20

Siyah renge boyanan salyangozların üç aylık estivasyon sürecinde, bireylerin estivasyon öncesi ve sonrası ağırlık ölçüm değerlerinde istatistiki olarak çok önemli farklılıklar ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Yaz uykusu sürecinde

salyangoz kabuk ölçümlerinin estivasyon başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında (yükseklik ve genişlik), istatistiksel bir farklılık görülmemiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Siyah renge boyanan salyangozların estivasyon başlangıç ve bitişindeki ağırlık, yükseklik ve genişlik ölçümlerine ait tanımsal istatistik değerleri (ort±SH).

Siyah Boyalı Grup (SBG)	Estivasyon Başlangıç	Estivasyon Çıkış	N
Ağırlık	28,22±1,35	21,28±1,32	20
Yükseklik	37,53±1,11	37,46±1,08	20
Genişlik	27,42±1,06	27,38±0,95	20

Beyaz Renge boyanan bireylerin estivasyon başında ve çıkışında beyaz rengin vücut ağırlığı üzerine bir etkisinin olmadığı aynı zamanda

yükseklik ve genişlik değerleri arasında da istatistiksel ($p<0,05$) bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Beyaz renge boyanan bireylerin estivasyon öncesi ve sonrası ağırlık, yükseklik ve genişlik ölçümlerine ait tanımsal istatistik değerleri (ort±SH).

Beyaz Boyalı Grup (BBG)	Estivasyon Başlangıç	Estivasyon Çıkış	N
Ağırlık	27,63±1,42	25,92±1,71	20
Yükseklik	37,12±0,96	37,08±0,82	20
Genişlik	26,95±10,13	26,83±1,14	20

Araştırmada kabuklarına boyama yapılmamış kontrol grubuna bakıldığında, salyangozların estivasyon öncesi ve sonrası ağırlık, yükseklik

ve genişlik değerleri arasında istatistiksel anlamda bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Kontrol grubundaki bireylerin estivasyon öncesi ve sonrası ağırlık, yükseklik ve genişlik ölçümlerine ait tanımsal istatistik değerleri (ort±SH).

Kontrol Grup (KG)	Estivasyon Başlangıç	Estivasyon Çıkış	N
Ağırlık	28,02±1,64	24,66±1,24	20
Yükseklik	37,72±1,23	37,75±1,96	20
Genişlik	27,01±1,37	26,98±1,85	20

Hipometabolizmik davranış

Estivasyona giriş aşaması: Doğadan Mayıs ayı başında toplanan salyangozlar penlere yerleştirildikten sonra ilk 2 gün yemleme yapılmamıştır. 3. günden itibaren salyangozlara marul verilerek serbest yemlemeye geçilmiştir. Haziran ayı sonuna kadar salyangozlar, yemlenme dışında kalan sürede, siyah renge boyalı H. lucorum'lar daha çok pen içindeki toprak alanı tercih ederek gezinti davranışı sergilemiştir. Beyaz renge boyalı olanlar, genelde penin cam yüzeyinde gezinmeyi tercih etmişlerdir. Kontrol grubundakiler ise hem cam yüzeyde hem de pen içindeki toprak alanda hareketlilik göstermişlerdir (Tablo 5).

Estivasyon dönemi: Haziran 2018 sonunda başlayan bu dönemde, siyah renge boyalı salyangozların çoğunluğu toprak alanı, beyaz renkte olanlar penin cam yüzeyinde ve kontrol grubundakiler benzer oranlarda toprak alan ve

cam yüzeyde sabitlenmeyi tercih etmişlerdir (Tablo 6).

Estivasyondan çıkış: Eylül 2018 başında salyangozlarda uyanışlar gözlemlenmiştir. Hareketlilik bölgeleri bakımından incelendiğinde, genellikle üç grupta estivasyon öncesi hareketlilik gösterdikleri alanları tercih ederek gezinme davranışı göstermişlerdir (Tablo 7). Estivasyondan çıkış gün sayısına bakıldığında siyah boyalı grup %40 oranında 1.gün yaz uykusundan uyanmıştır. Bu süreci 4.günde %100 uyanışla siyah boyalı grup tamamlamıştır. Beyaz renge boyalı grup 10.günde, kontrol grubu ise 5.günde tamamıyla uyanışı gerçekleştirmişlerdir (Tablo 8). Estivasyon çıkışında en yüksek yaşama oranı beyaz boyalı grupta (%98), en düşük oran ise siyah grupta (%85) tespit edilmiştir.

Tablo 5. Salyangozların estivasyona giriş aşamasında hipometabolizmik davranışları.

Estivasyona Giriş (Haziran 2018)				
Türler (n=20)	Hareketlilik Bölgesi	Tercih Edilen Beslenme Zamanı	Mukus ve Dışkı Bırakma Yeri ve Sıklığı	Sabitlenme Bölgesi
Siyah Boyalı Grup (SBG)	Penin toprak alanı	Akşam	Toprak alan, Hareketli olduğu sürece	Yok
Beyaz Boyalı Grup (BBG)	Penin cam yüzeyi	Sabah, öğlen, akşam	Cam yüzeyi, Sürekli	Yok
Kontrol Grup (KG)	Penin cam yüzeyi ve toprak alanı	Sabah (erken), akşam (geç)	Cam yüzeyi ve toprak alan, sürekli	Yok

Tablo 6. Salyangozların estivasyon dönemi hipometabolizmik davranışları.

Estivasyon Dönemi (Haziran, Temmuz, Ağustos 2018)				
Türler (n=20)	Hareketlilik Bölgesi	Beslenme Zamanı Tercihi	Mukus ve Dışkı Bırakma Yeri ve Sıklığı	Sabitlenme Bölgesi
Siyah Boyalı Grup (SBG)	Yok	Yok	Yok	Toprak alan (%80)
Beyaz Boyalı Grup (BBG)	Yok	Yok	Yok	Cam yüzeyi (%90)
Kontrol Grup (KG)	Yok	Yok	Yok	Cam ve toprak alan (%50)

Estivasyon döneminde farklı kabuk renklerinin etkisi

Tablo 7. Salyangozların estivasyondan çıkış aşamasında hipometabolizmik davranışları.

Estivasyondan Çıkış (Eylül 2018)						
Türler (n=20)			Hareketlilik Bölgesi	Beslenme Zamanı Tercihi	Mukus ve Dışkı Bırakma Yeri ve Sıklığı	Sabitlenme Bölgesi
Siyah (SBG)	Boyalı	Grup	Çoğunlukta pen içindeki toprak alanda	Çoğunlukta akşam	Toprak alan Hareketli olduğu sürece	Yok
Beyaz (BBG)	Boyalı	Grup	Çoğunlukta penin cam yüzeyi	Sabah, öğlen, akşam	Cam yüzeyi, Sürekli	Yok
Kontrol Grup (KG)			Penin cam yüzeyi ve toprak alanı	Çoğunlukta sabah, akşam	Cam yüzeyi ve toprak alan, sürekli	Yok

Tablo 8. İlk on günde salyangozların (H. lucorum) estivasyon döneminin bitiş oranları (%).

Uyanış (gün)	Siyah Boyalı Grup (%)	Beyaz Boyalı Grup (%)	Kontrol Grubu (%)
1.gün	40	5	34
2.gün	67	15	56
3.gün	88	28	83
4.gün	100	46	96
5.gün	100	62	100
6.gün	100	75	100
7.gün	100	84	100
8.gün	100	93	100
9.gün	100	98	100
10.gün	100	100	100

Hava sıcaklığının yükselmeye başladığı zaman salyangozlar kabuklarının iç bölgesine çekilerek estivasyon sürecini geçirmişlerdir. Bu süreçte besin ve su alışı olmadığı için canlı ağırlıkta bir azalma söz konusu olmuştur. Bu azalmanın siyah, beyaz ve doğal kabuk rengindeki bireyler arasında oransal karşılaştırması yapıldığında,

siyah renge boyanan bireyler kurak süreci beyaz ve siyah renge göre %24,59 oranında canlı ağırlık kaybı ile tamamlamıştır. Estivasyon sürecinde beyaz rengin, siyah boyalı renge ve boyalı olmayan kontrol grubuna göre avantajlı bir oranda (%6,18) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Siyah ve beyaz renge boyanmış bireyler ile kontrol grubundaki bireylerin estivasyon sonrası canlı ağırlık ölçüm değerlerinin karşılaştırılması (ort±SH).

Ağırlık (g)	Estivasyon Başlangıç	Estivasyon Çıkış	Ağırlık kaybı (%)	Yaşama Oranı (%)
Siyah Boyalı Grup (SBG)	28,22±1,35 ^a	21,28±1,32 ^a	24,59	85
Beyaz Boyalı Grup (BBG)	27,63±1,42 ^a	25,92±1,71 ^b	6,18	98
Kontrol Grup (KG)	28,02±1,64 ^a	24,66±1,24 ^b	11,99	93

BULGULAR

Salyangozların vücut yüzeyini kaplayan tabaka tarafından absorbe edilen enerji miktarı, yüzey rengi koyulaştıkça artmaktadır (Exnerova vd., 2006). Doğada koyu renkli salyangozların kurak aylarda daha az ışıklı, ışıktan ve sıcaktan

daha korunaklı bölgelerde barındığı gözlenmiştir (Badyaev & Hill, 2000). Moreno-Rueda (2008)'nin yaptığı bir çalışmada, kabukları siyah renge boyanmış salyangozların (Sphincterochila candidissima) kontrol grubu olan salyangozlardan daha fazla ağırlık

kaybettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise ortalama ağırlık değerleri dikkate alındığında, kontrol grubu ile beyaz ve siyah grupları arasında önemli bir farkın olmadığı ($P>0,05$), ancak siyah renge boyanan bireylerin estivasyon öncesi ve sonrası ağırlık, yükseklik ve genişlik değerlerinde istatistiki olarak çok önemli farklılıklar ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Bu sonucun dayandığı en belirgin sebep, siyah renk ile boyanmış kabuklarda ışık yansımalarının daha düşük olması ve bu nedenle diğer salyangoz türleri ile yapılan diğer çalışmalarda gösterildiği gibi daha fazla ısı tutması olarak belirtilmektedir (Heath, 1975; Moreno-Rueda, 2008). Yapılan araştırmalarda, sıcaklığın artış ve azalışındaki kritik sınırdaki (estivasyon süreci) ağırlık kaybının olduğu (Onadeko, 2010), estivasyon döneminde, hemolenf yoluyla, mineral tuzlarının kabuktan ilgili hücrelere ve bağırsak sıvısına taşındığı ve bu süreçte salyangoz kabuk kalınlığında azalmalar olabileceği bildirilmektedir (Porcel vd., 1996). Yom-Tov (1971)'un bildirdiğine göre, vücut sıcaklığının artışı su kaybını artırarak vücut ağırlığını düşürmektedir. Salyangozlarda gövde büyüklüğünün, kabuk rengi ile sıcaklık emilimi arasındaki etkileşimi etkileyebildiği bildirilmektedir (Slotow vd., 1993). Literatürde sunulan sonuçlar, beyaz rengin kurak yaşayan salyangozlarda hayatta kalmak için avantajlı olduğunu göstermektedir (Heller, 1984). Şereflişan ve Alkaya (2019)'nın yaptığı bir çalışmada, kabukları siyah renge boyanmış olan *Helix aspersa*'nın estivasyon döneminde ağırlık kaybettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, estivasyon sonrası siyah, beyaz ve kontrol grubunun ağırlık, yükseklik ve genişliklerinin karşılaştırılması sonucunda, genişlik ve yükseklik ortalama değerleri arasında gruplar arası farkın istatistiki olarak önemli olmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir. Bunun yanında kontrol grubu ile beyaz grup arasında önemli bir farkın olmadığı ($P>0,05$), ancak ortalama ağırlık değerleri açısından siyah ve beyaz gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farkın olduğu ($P=0,01$) tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Sonuç ve öneriler

Karada yaşayan salyangozlar, kurak mevsimlerde yaz uykusu sürecine girerek bu zorlu süreçte kendilerini korumak için çaba

harcamaktadırlar. Özellikle bu dönemde vücut su kaybını dengede tutmak en büyük gereksinimleridir. Salyangozların vücut sıcaklığının kabuk rengi ile doğrusal bir ilişkide olduğu birçok çalışmada belirlenmiştir. Kabuk renginin ağırlık kaybına etki ettiği hipotezini ve bunun bir sonucu olarak, termoregülasyonun aracılık ettiği bir mekanizmayı desteklediği ortaya konulmuştur. Bu araştırmadan elde edilen sonuç, yetiştiricilik açısından değerlendirildiğinde, kurak ortamda yapılan yetiştiricilikte ağırlık kaybının olmaması konusunda türün kabuk renginin önemli olduğuna dikkat çekilmektedir.

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Çalışma materyalini oluşturan salyangozlar omurgasız canlılardan oldukları için 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı resmî gazetede yayınlanan hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğe göre etik kurul izni gerekli değildir.

Çıkar çatışması: Yazar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını ve herhangi bir finansal destek alınmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adeyeye, E.I., & Afolabi, E.O. (2004).** Amino acid composition of three different types of land snails consumed in Nigeria. *Food Chemistry*, 85, 535-539.
- Akman, M.A.A., Yazar, S., Şahin, İ., & Yıldırım, Z. (2005).** Kayseri Karpuz Sekisi Havzasında Tatlı Su Gastropodlarının Araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14(1), 1-5.
- Arad, Z., Goldenberg, S., & Heller, J. (1989).** Resistance to desiccation and distribution patterns in the land snail *Sphincterochila*. *Journal of Zoology*, 218, 353-364.
- Badyaev, A.V., & Hill, G.E. (2000).** Evolution of sexual dichromatism: contribution of carotenoid versus melanin-based coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69, 153-172.
- Cloudsley-Thompson, J.L. (1978).** Adaptive function of the colour of desert animals. *Comparative Physiological Ecology*, 1, 109-120.
- Cook, A. (2001).** Behavioural ecology: On doing the right thing, in the right place at the right time. In Barker, G. M. (Ed.): *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB International. Wallingford. p. 447-487.

- Exnerova, A., Svadora, K., Barcalova, S., Landova, E., Prokopova, M., Fuchs, R., & Socha, R. (2006).** Importance of colour in the reaction of passerine predators to aposematic prey: experiments with mutants of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 88, 143-153.
- Giokas, S., Karkoulis, P., Pafilis, P., & Valakos, E. (2007).** Relictual physiological ecology in the threatened land snail *Codringtonia helenae*: A cause for decline in a changing environment? *Acta Oecologica*, 32, 269-278.
- Heath, D. J. (1975).** Colour, sunlight and internal temperatures in the land-snail *Cepaea nemoralis* (L.) *Oecologia*, 19, 29-38.
- Luchtel, D.L., & Deyrup-Olsen, I. (2001).** Body wall: form and function. In Barker, G.M. (Ed.), *The biology of terrestrial molluscs* (p. 147-178). Wallingford UK.: CAB International.
- Moreno-Rueda, G. (2002).** Selección de hábitat por *Iberus gualtierianus*, *Rumina decollata*, *Sphincterochila candidissima* (Gastropoda: Pulmonata) en una sierra del sureste español. *Iberus*, 20, 55-62.
- Moreno-Rueda, G. (2007).** Refuge selection by two sympatric species of arid-dwelling land snails: Different adaptive strategies to achieve the same objective. *Journal of Arid Environments*, 68, 588-598.
- Moreno-Rueda, G., & Collantes-Martín, E. (2007).** Annual cycle of activity of the land-snail *Sphincterochila* (*Albea*) *candidissima* (Draparnaud, 1801) in a semi-arid environment. *Iberus* 25, 49-56.
- Moreno-Rueda, G. (2008).** The colour white diminishes weight loss during aestivation in the arid-dwelling land snail *Sphincterochila* (*Albea*) *candidissima*. *Sociedad Española de Malacología, Iberus*, 26 (1), 47-51.
- Onadeko, S.A. (2010).** Live weight changes and mortality rate in the giant African snail *Archachatina marginata* during six week aestivation period. *World Journal of Zoology*, 5(2), 75-81.
- Pedler, S., Fuery, C.J., Withers, P.C., Flanigan, J., & Guppy, M. (1996).** Effectors of metabolic depression in an estivating pulmonate snail (*Helix aspersa*): whole animal and in vitro tissue studies. *Journal of Comparative Physiology B*, 166(6), 375-381.
- Porcel, D., Bueno, J.D., & Almendros, A. (1996).** Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 115(1), 11-17.
- Prior, D.J. (1985).** Water-regulatory behaviour in terrestrial gastropods. *Biological Reviews*, 60, 403-424.
- Richardson, A.M.M. (1974).** Differential climatic selection in natural population of land snail *Cepaea nemoralis*. *Nature*, 247, 572-573.
- Schmidt-Nielsen, K., Taylor, C.R., & Shkolnik, A. (1971).** Desert snails: problems of heat, water and food. *Journal of Experimental Biology*, 55, 385-398.
- Schütt, H. (1993).** Türkische Landschnecken. Prodrömus faunae Anatolicae molluscorum terrestrium viventium testaceorumque. - Vorläufige Zusammenstellung der aus Anatolien bekannt gewordenen gehäusetragenden Landschnecken. - Türkiye'nin karasal salyangozları. - Wiesbaden. (Hemmen), p. 1-433.
- Steinberger, Y., Grossman, S., & Dubinsky, Z. (1981).** Some aspects of the ecology of the desert snail *Sphincterochila prophetarum* in relation to energy and water flow. *Oecologia*, 50, 103-108.
- Steinberger, Y., Grossman, S., Dubinsky, Z., & Shachak, M. (1983).** Stone microhabitats and the movement and activity of desert snails, *Sphincterochila prophetarum*. *Malacological Review*, 16, 63-70.
- Storey, K.B. (2002).** Life in the slow lane, molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 134, 733-754.
- Şereflişan, H., & Alkaya, A. (2019).** Estivasyon Döneminde Siyah Rengin Kara Salyangozunun (*Helix Aspersa*) Ağırlık Kaybı Üzerine Etkisi. *1st International Conference on Environment, Technology and Management*, Niğde, Turkey, 660-665, 27-29 Haziran 2019.
- Thery, M., Debut, M., Gomez, D., & Casas, J. (2005).** Specific color sensitivities of prey and predator explain camouflage in different visual systems. *Behavioral Ecology*, 16, 25-29.
- Umezurike, G.M., & Iheanacho, E.N. (1983).** Metabolic adaptations in aestivating giant African snail (*Achatina achatina*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 74, 493-498.
- Yom-Tov, Y. (1971).** Annual fluctuations in the water content of desert snails. *Malacological Review*, 4, 121-126.

Effects of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) on Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) and Antioxidant Parameters in Rabbits

Mustafa Makav^{1a}Mükremin Ölmez^{2b}

ABSTRACT

Many studies have been conducted on medicinal aromatic plants in recent years. Alternative medicine particularly comes to the fore as an alternative to the use of synthetic agents. The antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antiviral effects of phenolic compounds, especially in the structure of aromatic plants, are known. Among those well-known aromatic plants, Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) is known to contain a large amount of phenolic compounds. In our study, by taking these effects of phenolic compounds into consideration, the effectiveness of pennyroyal on antioxidant parameters and Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), and that has many important functions in the organism, was evaluated. A total of 15 New Zealand rabbits were used in the study. The animals were divided into three experimental groups with 5 rabbits in each group. While no Pennyroyal was added to the control group, 0,1% and 0,2% were added to the diets for the other groups. All groups were fed ad-libitum. On the 14th day of the experiment, serum ACE2, GSH and MDA levels were determined with blood taken from the ears of the rabbits. According to the analysis results, while a decrease in ACE2 and MDA levels was determined in the groups which were given 0,1% and 0,2% Pennyroyal compared to the control group, a significant increase was observed in the GSH level. As a result, determined the antioxidant effect of Pennyroyal as well as the effect of decreasing the serum ACE2 level.

Keywords: Angiotensin-converting enzyme 2, Pennyroyal, GSH, MDA, Covid-19

INTRODUCTION

In recent years, with the increased interest in medicinal and aromatic plants and the active ingredients derived from these plants, studies that reveal the effects of these plants on humans and animals have been brought to the agenda (Baytop, 1999). The secondary metabolites of these plants have found widespread use in traditional medicine due to their potential for pharmaceutical and biological properties. Secondary metabolites have shown several biological and pharmaceutical effects in plants, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities (Zengin et al., 2018). Some of the nearly 300 plant families that grow in nature have an important place. Among those, Labiatae (Lamiaceae) family has been widely used in the world for many purposes (Ishtiaq et al., 2014). It is the genus *Mentha*, which is a large member of this family and spreads from the Mediterranean to Central Asia (Ceylan, 1997).

How to cite this article

Makav M., Ölmez, M. (2021). Effects of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) on Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) and Antioxidant Parameters in Rabbits. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 9-14. <https://doi.org/10.31797/vetbio.839675>

¹Department of Physiology,
Faculty of Veterinary
Medicine, Kafkas University,
Kars, Turkey

²Department of Animal
Nutrition and Nutritional
Diseases, Faculty of
Veterinary Medicine, Kafkas
University, Kars, Turkey

ORCID-

[*0000-0003-1879-8180](https://orcid.org/0000-0003-1879-8180)[b0000-0002-5003-3383](https://orcid.org/0000-0002-5003-3383)

Correspondence

Mustafa Makav

mustafamakav@gmail.com

Article info

Submission: 12-12-2020

Accepted: 09-03-2021

Online First: 07-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

<http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0
International License



This genus has more than twenty species. *Mentha* plants have been used extensively in medicine, food and cosmetics for many years (Karadoğan et al., 2003; Villaverde et al., 2016). Additionally, *Mentha* plants exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antiviral effects due to their rich flavonoid and phenolic compounds (Baratta et al., 1998; Kasrati et al., 2015; Lee & Shibamoto, 2002).

Pennyroyal (*Mentha pulegium*) is a perennial aromatic herbaceous plant belonging to the genus *Mentha* that can grow up to half a meter in height (Gruenwald et al., 2000). The dried parts and the essential oil obtained from them are widely used in traditional medicine (respiratory system disorders, digestion, liver and gall bladder disorders), gastronomy (spices, snacks), aromatherapy and cosmetics (Agnihotri et al., 2005; Ahmed et al., 2018; Gruenwald et al., 2000; Rodrigues et al., 2013).

Free radicals are molecules with unpaired electrons in their outer orbits. Free radicals occur naturally in the body and are important intermediates in natural processes involving the control of vascular tone, cytotoxicity, and neurotransmission. However, the presence of free radicals in high concentrations can damage all cell structures including DNA, proteins and cell membranes that cause many diseases in humans and animals such as atherosclerosis, cancer, diabetes, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, genital track infection, inflammation, aging and other degenerative diseases. The antioxidant defense system contains antioxidant components and antioxidant enzymes and plays an important role in delaying and preventing the oxidation of biomolecules such as DNA and protein. Aromatic plants are classified as natural antioxidants because they contain phenolic compounds that reduce the formation of free radicals and have antioxidant activity, and many studies have indicated that they can be used as a replacement for synthetic antioxidants with side

effects (Grimsrud et al., 2008; Keller, 2006; Kuru et al., 2016).

Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) is a homologue of an Angiotensin converting enzyme (ACE) discovered in 2000 (Donoghue et al., 2000). Although there is a similarity between ACE and ACE2, their functions are completely different. Although ACE2 is widely found in the heart, kidney, lung and testis, a small amount is also found in the circulation (Serfozo et al., 2020; Tipnis et al., 2000). In the last months of 2019, it has been reported that ACE2 enzyme is one of the primary receptors in the entry and attachment of the coronavirus in the human body, which is described as a new type of coronavirus infection (SARS-CoV-2,) which appeared in Wuhan, China, and caused a pandemic (H. Cheng et al., 2020; Lu et al., 2020).

In this study, the effects of Pennyroyal added to rabbits' feed on serum ACE2 levels and antioxidant parameters were investigated.

MATERIALS and METHODS

Animals and experiment design

In the study, 15 female New Zealand rabbits weighing 1500-2500 g were used. Rabbits were obtained from Atatürk University Experimental Animal Breeding Unit, which is officially authorized to breed and sell test animals. The animals were housed in cages specially designed for their species and were fed ad-libitum. The temperature of the room where the animals were housed was set to 25°C, and the lighting was set to be 12 hours light and 12 hours dark. The rabbits were fed a basal ration containing 24% crude protein, 3,2% crude fat, 5,90% crude fiber and 3300 kcal / kg metabolic energy (NRC, 1995). Experiment Groups;

Group I: Control group (C) fed ad-libitum without any intervention,

Group II: The group in which 0.1% Pennyroyal powder (P1) was added to the feed for 14 days,

Group III: The group in which 0.2% Pennyroyal powder (P2) was added to the feed for 14 days,

Pennyroyal (*M. pulegium*)

Pennyroyal used in the study was collected in the season from Bogatepe village (40 ° 48'21.2 "N 42 ° 53'37.8" E / Turkey) of Kars province, dried and ground. The GC/MS analysis of Pennyroyal (*M. pulegium* L.) was performed by obtaining essential oil through water vapor distillation method. The results of the analysis showed that the major compounds of the Pennyroyal were Linalool (13,61%) and Menthone (10,56%).

Sampling and analysis

At the end of the study (14th day), blood samples were taken from the ear vena of the animals into anticoagulated tubes. The blood samples taken were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes, and their plasma was stored at -20°C until the day of analysis. Plasma ACE2 levels were determined according to the kit procedure using commercial kits of Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA- Elabscience® USA). While GSH analysis was determined according to the Beutler (1963) method, Yoshioka et al. (1979) method was used in MDA analysis.

Statistical analyses

Analysis of variance (ANOVA) was conducted for all the biochemical parameters to test if there is a difference among the three groups. The mean separation among groups was performed utilizing Tukey's test. An experiment-wise p-value of $\leq 0,05$ was deemed to be statistically significant throughout the study. All the analyses were conducted using GraphPad 8.1 (San Diego, CA, USA).

RESULTS

The efficacy of Pennyroyal addition on blood plasma ACE2, GSH and MDA levels in rabbits is presented in Figure 1. There was a decrease in plasma ACE-2 levels in the diet of the P1 and P2 groups compared to the C group ($P < 0,0001$). There was a significant increase in the GSH level in the P2 group compared to the C group ($P < 0,001$). There was no difference in the P1 group compared to the C group ($P > 0,05$). When the P1 and P2 groups were evaluated, a significant increase was found in the P2 group compared to the P1 group ($P < 0,05$). There was a significant decrease in the MDA level in the P2 group compared to the C group ($P < 0,0001$). It was determined that there was no difference between the P1 group and C group ($P > 0,05$). However, when the P1 and P2 groups were evaluated, a significant decrease was found in MDA levels in the P2 group compared to the P1 group ($P < 0,001$).

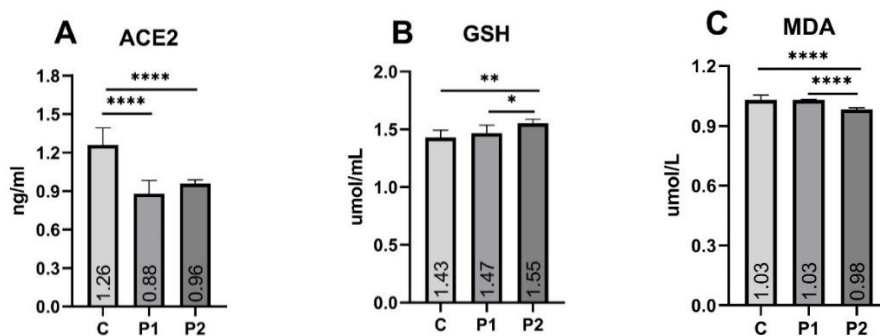


Figure 1. Means and Std. Errors of the three groups for (A, B, C) for biochemical parameters. * p<0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001

DISCUSSION

Aromatic plants and their products have been used by researchers as an alternative method in combating many diseases since the first days of the disease (Asdadi et al., 2020; Hansen Chen & Du, 2020; Senthil Kumar et al., 2020). In the present study, were determined the effectiveness of the dietary intake of Pennyroyal from aromatic plants on circulating ACE2 levels. Similar to the results of the study, it was determined that essential oils bind and inhibit ACE2 by in vitro and molecular docking methods. The researchers have reported that by decreasing ACE2 expression, the attachment of the virus to host cells can be reduced or prevented, however, this mechanism is an issue that needs to be clarified (H Chen & Du 2020; L. Cheng et al., 2020; da Silva et al., 2020; Senthil Kumar et al., 2020; Thuy et al., 2020). However, experiments do not show the efficacy of Pennyroyal and aromatic plants on ACE2 in in vivo settings, and intensive in vivo studies are needed in this area (Andrew M. South et al., 2020). ACE2 provides a vasodilator effect by inhibiting ACE (Vickers et al., 2002).

ACE2 is the binding receptor of the coronavirus. Especially, it plays the primary role in the penetration of the coronavirus into the lungs in the respiratory system (Batlle et al., 2008). During the Covid-19 pandemic process, emphasis has been placed on studies on ACE2, and according to the studies, it has been concluded that it may be more effective to prevent the entry of infection into the organism. Studies conducted in this context have focused on therapeutic approaches to prevent infection, especially by decreasing the ACE2 level (Andrew M South et al., 2020). In addition, the present study was performed in healthy rabbits to determine the effects on protection from infection before exposure to possible Covid-19 infection. However, it is important to carry out intensive studies in order to determine how Pennyroyal will affect the ACE2 levels in

humans and the daily dose to be consumed for protection.

Oxidative stress occurs when reactive oxygen species (ROS) production exceeds the capacity that natural antioxidant defense mechanisms of organism can cope with. It damages macromolecules such as DNA, proteins and lipids (Bartsch and Nair, 2000; Macdonald et al., 2010). This is generally characterized by increases in malondialdehyde (MDA) and GST activities and decreases in GSH production. Increased MDA is a marker of lipid peroxidation caused by oxidative damage. Reduced glutathione (GSH) is an endogenous antioxidant which plays a vital role in detoxification of xenobiotics and clearance of free radicals or ROS in cells (Albano et al., 1998; Macdonald et al., 2010; Kuru et al.).

Many studies have detected the antioxidant activity of Pennyroyal (Cherrat et al., 2014; Kamkar et al., 2010; Ölmez, 2018; Teixeira et al., 2012). Similarly, in the present study, the increase in the level of GSH, which shows antioxidant activity, and the decrease in the level of MDA used in determining lipid peroxidation with the effects of Pennyroyal reveal that Pennyroyal may have a good antioxidant characteristic. There are also studies reporting that the antioxidant activity of Pennyroyal is not important (Marzouk et al., 2008). It is known that the difference in antioxidant activity is due to the chemical composition of the Pennyroyal used, which varies depending on the geography. It has also been reported that the use of the plant itself may produce different results with the use of essential oil (Kamkar et al., 2010; Teixeira et al., 2012). An increase in the number of animal trials is needed to determine the antioxidant activity of Pennyroyal.

As a result, in addition to being a good antioxidant substance, Pennyroyal has an important ACE2 receptor reducing effect. In this context, it is seen that the use of Pennyroyal

can be particularly effective on some infections. In addition, considering the hypertensive patients, it is important to pay attention to its use in these patients due to its ACE2 reducing effect. However, since there are not many studies on the subject, more similar studies need to be conducted.

CONCLUSION

As a result, in addition to being a good antioxidant substance, Pennyroyal has an important ACE2 receptor reducing effect. In this context, it is seen that the use of Pennyroyal can be particularly effective on some infections. In addition, considering the hypertensive patients, it is important to pay attention to its use in these patients due to its ACE2 reducing effect. However, since there are not many studies on the subject, more similar studies need to be conducted.

ACKNOWLEDGEMENT

Ethical approval: The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experimental Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK / 2020-124)

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest for this study.

REFERENCES

Agnihotri, V., Agarwal, S., Dhar, P., Thappa, R., Kapahi, B., Saxena, R., & Qazi G. N. (2005). Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 607-10.

Ahmed, A., Ayoub, K., Chaima, A. J., Hanaa, L., & Abdelaziz, C. (2018). Effect of drying methods on yield, chemical composition and bioactivities of essential oil obtained from Moroccan *Mentha pulegium* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 638-643.

Albano, E., French, S. & Ingelman-Sundberg, M. (1994). Cytochrome p450 2E1, hydroxyl ethyl radicals, and immune reaction associated alcoholic liver injury. Alcoholism: *Clinical and Experimental Research*, 18:1057-1068.

Asdadi, A., Hamdouch, A., Gharby, S., & Hassani, L. M. I. (2020). Chemical characterization of essential oil of *Artemisia herba-alba* asso and his possible potential against covid-19. *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology*, 2(2), 2-, 2020, pp. 67-72.

Baratta, M. T., Dorman, H. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-44.

Bartsch, H., & Nair, J. (2000). Ultrasensitive and specific detection methods for exocytic DNA adducts; markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology*, 153: 105-114.

Batle, D., Soler, M. J., & Wysocki, J. (2008). Renin-Anjiyotensin Sistemini Yeni Yönlere: Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim 2: Hipertansiyon ve Diyabetik Nefropatinin Tedavisi için Potansiyel Bir Hedef. *Türkiye Klinikleri Nefroloji Dergisi*, 3(2), 99-108.

Baytop, T. (1999). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*: Nobel Tıp Kitabevleri.

Beutler, E. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. lab. clin. Med.*, 61, 882-8.

Ceylan, A. (1997). *Tıbbi bitkiler II:(uçucu yağ bitkileri)*: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi.

Chen, H., & Du, Q. (2020). Potential natural compounds for preventing SARS-CoV-2 (2019-nCoV) infection. *Preprints*.

Cheng, H., Wang, Y., & Wang, G. Q. (2020). Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *Journal of medical virology*

Cheng, L., Zheng, W., Li, M., Huang, J., Bao, S., Xu, Q., & Ma, Z. (2020). Citrus fruits are rich in flavonoids for immunoregulation and potential targeting ACE2.

Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 221-229.

da Silva, J. K. R., Figueiredo, P. L. B., Byler, K. G., & Setzer, W. N. (2020). Essential Oils as Antiviral Agents, Potential of Essential Oils to Treat SARS-CoV-2 Infection: An In-Silico Investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3426.

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., & Acton, S. (2000). A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*, 87(5), e1-e9.

Grimrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., & Bernlohr, D. A. (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32), 21837-41.

Gruenewald, J., Brendler, T., & Jaenicke, C. (2000). Physician's desk reference (pdr) for herbal medicines. *Ed. Montvale-w Jersey: Medical Economics Company*.

- Ishtiaq, S., Ahmad, M., Hanif, U., Akbar, S., & Kamran, S. H. (2014).** Phytochemical and in vitro antioxidant evaluation of different fractions of *Amaranthus graecizans* subsp. *silvestris* (Vill.) Brenan. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S342-S7.
- Kamkar, A., Javan, A. J., Asadi, F., & Kamalinejad, M. (2010).** The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1796-800.
- Karadoğan, T., Baydar, H., & Özçelik, H. (2003).** Göller yöresinde Lamiaceae familyasına dahil bitki türlerinin tespiti ve tıbbi ve aromatik değerlerinin belirlenmesi. *TÜBİTAK TOG TAG Proje(2599)*, 1-25.
- Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Bekkouche, K., Spooner-Hart, R., Leach, D., & Abbad, A. (2015).** Chemical Characterization and Insecticidal Properties of Essential Oils from Different Wild Populations of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley from Morocco. *Chemistry & Biodiversity*, 12(5), 823-31.
- Keller, J. N. (2006).** Interplay between oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006.
- Kuru, M., Ögün, M., Oral, H., Kükürt, A., Makav, M., & Kulaksız, R. (2016).** The use of controlled internal drug release for synchronization augmented oxidative and nitrosative stress and leptin levels in Georgian goats. *J. Cell. Neurosci. Oxid. Stress*, 8(1), 541-542.
- Lee, K.-G., & Shibamoto, T. (2002).** Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4947-52.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., & Tan, W. (2020).** Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-74.
- Macdonald, I. O., Olusola, O. J., & Osaigbovo, U. A. (2010).** Effects of chronic ethanol administration on body weight, reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels and glutathione-S-transferase activity (GST) in rats. *New York Science Journal*, 3(4), 3947.
- Marzouk, B., Fredj, M. B. H., Chraief, I., Mastouri, M., Boukef, K., & Marzouk, Z. (2008).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6(1), 78.
- NRC. (1995).** *Nutrient requirements of laboratory animals: 1995*: National Academies Press.
- Ölmez, M. (2018).** *Etlik piliç karma yemlerine ilave edilen yarpuzun (mentha pulegium l.) besi performansı, karkas kalitesi ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi*. Atatürk, Erzurum.
- Rodrigues, L., Póvoa, O., Teixeira, G., Figueiredo, A. C., Moldão, M., & Monteiro, A. (2013).** Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 43, 692-700.
- Senthil Kumar, K., Gokila Vani, M., Wang, C.S., Chen, C.C., Chen, Y.C., Lu, L.P., Huang, C.H., Lai, C.S., & Wang, S.Y. (2020).** Geranium and Lemon Essential Oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells. *Plants*, 9(6), 770.
- Serfozo, P., Wysocki, J., Gulua, G., Schulze, A., Ye, M., Liu, P., Jin, J., Bader, M., Myöhänen, T., García-Horsman, J.A., & Batlle, D. (2020).** Ang II (angiotensin II) conversion to angiotensin-(1-7) in the circulation is POP (prolyl oligopeptidase)-dependent and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2)-independent. *Hypertension*, 75(1), 173-82.
- South, A. M., Brady, T. M., & Flynn, J. T. (2020).** ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2), COVID-19, and ACE Inhibitor and Ang II (Angiotensin II) Receptor Blocker Use During the Pandemic. *Hypertension*, 76(1), 16-22.doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15291.
- South, A. M., Diz, D. I., & Chappell, M. C. (2020).** COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Nuno, R.N., José, M.F.N., Jorge, A.S., & Maria, L.N. (2012).** European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81-7.
- Thuy, B. T. P., My, T. T. A., Hai, N. T. T., Hieu, L. T., Hoa, T. T., Thi Phuong Loan, H., Triet, N.T., Anh T.T.V., Quy, P.T., Tat, P.V., Hue, N.V., Quang, D.T., Trung, N.T., Tung, V.T., Huynh, L.K., & Nhung, N.T.A. (2020).** Investigation into SARS-CoV-2 resistance of compounds in garlic essential oil. *ACS omega*, 5(14), 8312-20.
- Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000).** A human homolog of angiotensin-converting enzyme cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33238-43.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., & Tummino, P. (2002).** Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14838-43.
- Villaverde, J. J., Sandín-España, P., Sevilla-Morán, B., López-Goti, C., & Alonso-Prados, J. L. (2016).** Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends. *BioResources*, 11(2), 5618-40.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., & Mori, M. (1979).** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 135(3), 372-6.
- Zengin, G., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Mollica, A., Yilmaz, M. A., & Mahomoodally, M. F. (2018).** In vitro and in silico perspectives on biological and phytochemical profile of three halophyte species-A source of innovative phytopharmaceuticals from nature. *Phytomedicine*, 38, 35-44.

Diagnosis of pulmonary aspergillosis in geese by histopathological and microbiological methods

ABSTRACT

In this study, we aimed to determine the presence of pulmonary aspergillosis by histopathological and microbiological methods in geese that are economically grown in the Kars region of Turkey. Totally 150 lung tissue samples of geese, average age of 9 weeks, which died between 2013 and 2020 and were brought to our department were included in the study. In order to reveal the presence of *Aspergillus* fungi, Periodic acid-Schiff (PAS) staining was applied to the sections as suggested by manufacturer. The microbiological examination of the tissue samples was carried out by the standard mycological culture technique on Sabouraud Dextrose Agar and by the phenotypical characterization of the emerged cultures. We observed large and small multifocal yellowish-white nodular structures in the lungs and air sacs macroscopically. In the histopathological examination of the lung tissues, we detected granulomatous structures with varying numbers and sizes. We diagnosed the *Aspergillus* agents in 20 (13,33%) of the tissue samples by detecting structures resembling typical tree branches in the middle of granulomatous structures with PAS staining. An identical positivity was obtained by the microbiological method and the emerged agent was solely identified as *Aspergillus fumigatus* with the growth pattern and macroscopic and microscopic morphological features. In conclusion, we found the presence of aspergillosis as 13,33% by histopathological and microbiological methods in geese which were brought to our department between 2013-2020. Based on these data, we concluded that aspergillosis is one of the most important infectious diseases among the goose deaths in the Kars region of Turkey

Keywords: Aspergillosis, goose, histopathology, microbiology

INTRODUCTION

Aspergillosis is the systemic fungal disease caused by some species that belong the saprophytic, ubiquitous genus *Aspergillus* and can affect humans, dogs, cats, horses, marine mammals, wild and domestic birds, as well as invertebrates such as bees or corals (Tell et al., 2019; Della Vedova et al., 2019; Melo et al., 2020). Aspergillosis is mostly caused by *Aspergillus fumigatus* (accounts for approximately 95% of the cases), although rarely, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* species or mixed infections may play a role in the development of this disease (Tell et al., 2005; Beernaert et al., 2010). Aspergillosis is more common in birds than in mammals. Avian aspergillosis affects all species of domesticated birds, aquatic birds, wild birds and ornamental birds especially turkeys, chickens, white storks, ducks, quails, ostriches, parrots, canaries, pigeons, great rhea, flamingos, penguins, seagulls (Ziołkowska et al., 2014; Latif et al., 2015; Gulcubuk et al., 2018).

How to cite this article

Karakurt, E., Büyük, F., Dağ, S., Beytut, E., Çelebi, Ö., Akça, D., Nuhoglu, H., Yıldız, A., Kurtbaş, E. (2021). Diagnosis of pulmonary aspergillosis in geese by histopathological and microbiological methods. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 15-21. <https://doi.org/10.31797/vetbio.853459>

Research Article

Emin Karakurt^{1a}

Fatih Büyük^{2b}

Serpil Dağ^{1c}

Enver Beytut^{1d}

Özgür Çelebi^{2e}

Doğan Akça^{3f}

Hilmi Nuhoglu^{1g}

Ayfer Yıldız^{4h}

Emre Kurtbaş⁴ⁱ

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey

³Department of Midwifery, Faculty of Health Science, Kafkas University, Kars, Turkey

⁴Institute Health Sciences, Kafkas University, Kars, Turkey

ORCID-

^a[0000-0003-2019-3690](https://orcid.org/0000-0003-2019-3690)

^b[0000-0003-3278-4834](https://orcid.org/0000-0003-3278-4834)

^c[0000-0001-7667-689X](https://orcid.org/0000-0001-7667-689X)

^d[0000-0003-3360-2940](https://orcid.org/0000-0003-3360-2940)

^e[0000-0002-3478-008X](https://orcid.org/0000-0002-3478-008X)

^f[0000-0002-3986-8769](https://orcid.org/0000-0002-3986-8769)

^g[0000-0003-2530-2542](https://orcid.org/0000-0003-2530-2542)

^h[0000-0002-6569-5435](https://orcid.org/0000-0002-6569-5435)

Correspondence

Emin Karakurt

mehmeteminkarakurt@hotmail.com

Article info

Submission: 04-01-2021

Accepted: 09-03-2021

Online First: 07-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



The average age of animals affected by the avian aspergillosis outbreaks is between 3 days and 20 weeks, causing serious economic losses for the poultry industry (Aslan et al., 2015; Timurkaan et al., 2017). Aspergillosis is observed in two forms, acute (epizootic) and chronic (sporadic) disease varying in spectrum from local involvement to systemic dissemination (Leishangthem et al., 2015; Fagbohun et al., 2020). While the acute form of the disease causes high morbidity and mortality in young birds, the chronic form is usually observed in adult and immunocompromised birds, it is sporadic and has a lower mortality rate (Shoukat et al., 2018). The predisposing factors causing the disease can be briefly summarized as follows; species predilection, cage conditions, poor ventilation, malnutrition, toxins, vaccinations, long-term use of antibiotics-corticosteroids, moisture, inappropriate temperature, hygiene, contaminated food or bedding, trauma and transport (Seyedmousavi et al., 2015; Sa'idu et al., 2016; Savelieff et al., 2018). Difficulty in breathing, anorexia, cyanosis, diarrhea, weight loss, anorexia, loss of voice, involvement of the nervous system (lethargy, ataxia, opisthotonos, torticollis, limb paresis) and increased thirst are the main clinical findings of the disease (Tell et al., 2005; Leishangthem et al., 2015; Seyedmousavi et al., 2015). Histopathological lesions are characterized by granulomatous inflammation surrounded by a fibrous capsule associated with fungal hyphae. (Gulcubuk et al., 2018; Hauck et al., 2020). Since the clinical findings are not specific in aspergillosis, antemortem diagnosis is very difficult (Beernaert et al., 2010; Aslan et al., 2015). Methods such as cytology, culture, histopathology or PCR are used for the definitive diagnosis of the disease (Fagbohun et al., 2020). Sabouraud Dextrose Agar (SDA) agar is the preliminary chosen medium for the isolation of fungal species, even selectivity can be achieved with the addition of various

antibiotics such as chloramphenicol (Sahin et al., 1997; Nagano et al. 2008).

In this study, we aimed to determine the presence of pulmonary aspergillosis by histopathological and microbiological methods in geese that are economically grown in Kars region.

MATERIALS and METHODS

Animals

The material of this study was composed of lung tissue samples taken from 150 geese with an average age of 9 weeks, brought dead to our department for systemic necropsy between 2013-2020. Information on age and clinical findings of all animals are given in Table 1.

Microbiological investigations

For microbiological examination, the lungs tissue samples were cultured onto Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid) plates supplemented with chloramphenicol (0.05 mg/ml). Initially, the surface of the lungs were cauterized with a hot spatula and then the sample was taken from the inner-living part of the tissue with a loop and inoculated onto the Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates. The plates were incubated aerobically at 25 °C and 37 °C for 7 days. Following the incubation, the fungal isolates were identified by growth pattern and macroscopic and microscopic morphological features (Latge, 1999; Gautam and Bhadauria, 2012).

Histopathological investigations

After systemic necropsy of geese, the lung tissue samples were fixed in 10% buffered formalin solution. After routine procedures paraffin blocks were cut to 5 µm thickness and Hematoxylin & Eosin (H&E) staining was applied to the sections in order to detect histopathological changes. In order to reveal the

presence of *Aspergillus* fungi, Periodic acid–Schiff (PAS) staining was applied to the sections as suggested by by manufacturer (Facepath company, barcode number: 8681065133692). Sections were examined and photographed under a light microscope.

RESULTS

Clinical results

Various clinical symptoms such as difficulty breathing, wheezing, weakness, anorexia, depression, diarrhea and nervous signs were recorded in geese.

Microbiological results

Twenty (13,33%) lung tissue samples were found culture positives for mycotic agents. No fungal growth was observed in the remaining 130 tissue samples (Table 1). All fungal isolates were identified as *Aspergillus fumigatus* with some characteristics such as; the rapid growth pattern that the colony size can reach 4 ± 1 cm within the incubation period on SDA agar plates at 37°C; the macroscopical characteristics like entire margined umbonate colonies with green to the dark green surface and colourless to yellow reverse side colours; the microscopical characteristics like branched septated hyphae, dome-shaped vesicle conidiophores, roughened ornamented conidiospores with blue-green head, uniseriate phialides and cleistothecium fruiting body.

Macroscopical results

We detected that the lungs were darker red than their normal pink appearance. We observed

large and small multifocal yellowish-white nodular structures in the lungs and air sacs of 20 (13,33%) of 150 geese examined macroscopically (Figure 1 a-b).



Figure 1. Diffuse yellowish-white granulomas (arrows) in the lung.

Microscopical results

In the histopathological examination of the lung tissues, we detected granulomatous structures with varying numbers and sizes. We observed large areas of necrosis and fungal agents in the center of the granulomas. We also revealed the presence of foreign body giant cells, histiocytes, plasma cells and neutrophils around the necrotic areas. On the outermost layer, there were connective tissue capsules surrounding them (Figure 2a-c). We diagnosed *Aspergillus* agents, which resemble typical tree branches in the middle of granulomatous structures, using PAS stain (Figure 2d).

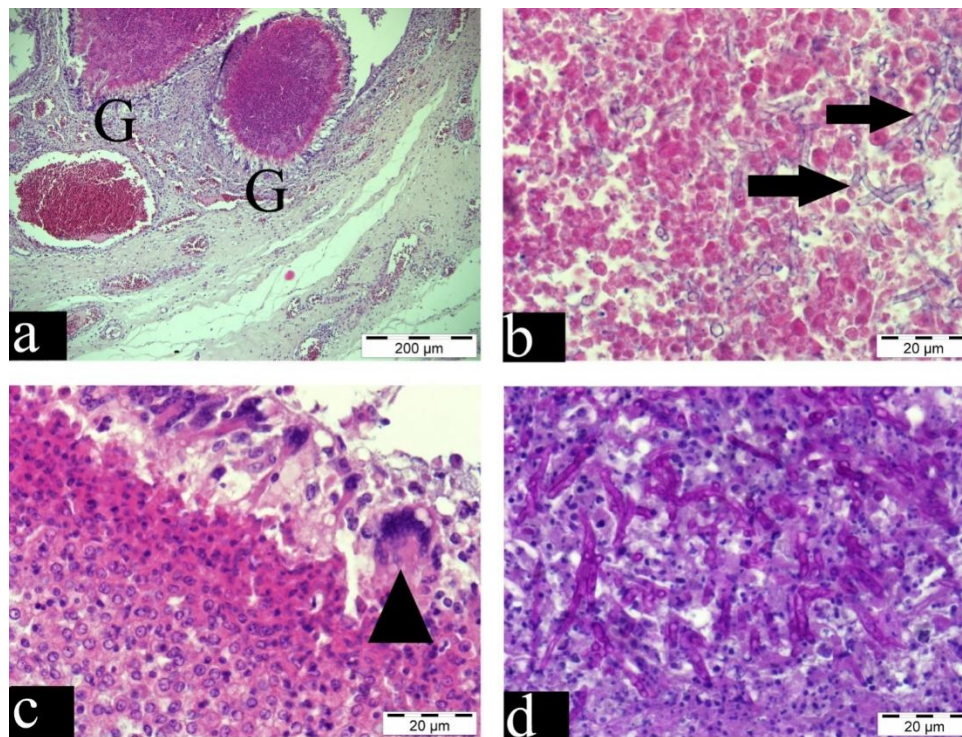


Figure 2. Lung tissue a: Granulomatous structures (G), H&E, Bar= 200µm, b: Aspergillus agents located in the necrotic area in the middle of the granulomas, H&E, Bar= 20µm, c: Lymphohistiocytic cell infiltration and foreign body giant cells (arrowhead) around necrotic area, H&E, Bar= 20µm, d: Hyphae that look like tree branches, PAS stain, Bar= 20µm

Table 1. Information on age, clinical symptoms, histopathological findings, PAS staining and microbiological results of all geese.

Case No	Age	Clinical Symptoms	Histopathological Results	PAS staining	Microbiological Results
Case 1	8 weeks	Difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 2	12 weeks	Diarrhea, nervous signs	Granuloma	+	+
Case 3	6 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 4	6 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 5	6 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 6	6 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 7	16 weeks	Difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 8	8 weeks	Difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 9	4 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 10	16 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 11	8 weeks	Wheezing, diarrhea	Granuloma	+	+
Case 12	10 weeks	Emaciation, difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 13	10 weeks	Anorexia, wheezing	Granuloma	+	+
Case 14	12 weeks	Weakness, difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 15	6 weeks	Wheezing, depression	Granuloma	+	+
Case 16	8 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 17	10 weeks	Difficulty breathing	Granuloma	+	+
Case 18	12 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 19	6 weeks	Wheezing	Granuloma	+	+
Case 20	10 weeks	Difficulty breathing	Granuloma	+	+

DISCUSSION

Important fungal diseases that threaten poultry production are Aspergillosis, Candidiasis, Dactylariosis, Favus, Mucormycosis, Histoplasmosis and Cryptococcosis (Fagbohun et al., 2020). In comparison to humans and many mammals, *Aspergillus* species play a role as a primary pathogen for birds (Tell et al., 2019). Birds are more susceptible to aspergillosis due to anatomical and physiological differences (Melo et al., 2020). These differences can be summarized as the birds do not have diaphragm, lack of epiglottis, poor vascularization and limited mucociliary function of the air sacs and heterophiles replacing neutrophils are less effective against hyphae invasion (Tell et al., 2005; Tell et al., 2019; Melo et al., 2020). *Aspergillus* spores are abundant in soil, rotten meat, forage, hay and all kinds of food, and as a result of inhalation of these spores, the lower respiratory system of birds is affected (Beytut, 2007; Gulcubuk et al., 2018). For this reason, it is called mycotic pneumonia (Özmen et al., 2007). The systemic form of the disease can affect the liver, kidneys, brain, bones, skin and eyes (Cacciuttolo et al., 2009). Since the findings of aspergillosis are not specific, the diagnosis of the disease is very difficult (Beernaert et al., 2010; Savelieff et al., 2018). Special stains such as culture, cytology, histopathology or PAS can be used for definitive diagnosis of the agent (Beyaz et al., 2008; Aslan et al., 2015; Timurkaan et al., 2017; Shoukat et al., 2018).

In this study, *Aspergillus* sp. was isolated in twenty (13,33%) of the lung tissue samples. These findings are similar to those reported by Abbas et al. (2017), who reported 15% of all types of *Aspergillus* spp. from pigeon, pet birds and chickens and those reported by Şahin et al. (1997), who reported an outbreak rate of 6,8% in geese in the identical region with this study. The sole and/or predominant agent causing aspergillosis in geese was identified as *A. fumigatus*, which is in great agreement with

those reported from different locations of the world (Şahin et al., 1997; Ziolkowska and Tokarzewski, 2007).

The mean age range of the geese with pulmonary aspergillosis was 9 weeks in this study. This finding is in accordance with the literatures (Okoye et al., 1989; Türkütanıt, 1999; Beytut et al., 2004). Various clinical symptoms such as difficulty in breathing, diarrhea, dyspnea, anorexia, emaciation, increased thirst and nervous signs have been reported in previous studies in geese (Ziolkowska et al., 2014; Sa'idu et al., 2016; Fagbohun et al., 2020). In our study, we obtained similar anamnestic informations from the owners of geese in accordance with the previous literature data (Ziolkowska et al., 2014; Sa'idu et al., 2016; Fagbohun et al., 2020).

We observed that the lung was a darker red than their normal pink appearance in the macroscopical examination of this organ, as reported by McDougale and Vaught (1968). We also detected large and small multifocal yellowish-white nodular structures in the lungs and air sacs, similar to those reported by different researchers (Okoye et al., 1989; Türkütanıt et al., 1999; Beytut et al., 2004; Yhee et al., 2007; Sa'idu et al., 2016).

In previous studies, granulomas (Ulloa et al., 1987; Türkütanıt et al., 1999; Beytut et al., 2004), large area of eosinophilic necrosis in the middle part of the granuloma (Türkütanıt et al., 1999; Beytut et al., 2004), histiocytes, lymphocytes, plasma cells and multinucleated foreign body giant cells around the necrotic area (McDougale and Vaught, 1968; Okoye et al., 1989; Türkütanıt et al., 1999; Beytut et al., 2004; Yhee et al., 2007; Sa'idu et al., 2016) were have been observed. Similar to the literature data (McDougale and Vaught, 1968; Ulloa et al., 1987; Okoye et al., 1989; Türkütanıt et al., 1999; Beytut et al., 2004; Yhee et al., 2007; Sa'idu et al., 2016), we also

observed necrotic granulomatous structures in the lung tissue of geese surrounded by mononuclear cells and multinucleated foreign body giant cells and connective tissue. In addition to these, we revealed the presence of typical tree branching or V-shaped hyphae in the PAS staining. We observed the *Aspergillus* agents localized within necrotic centers correlated with the findings of some researchers (Okoye et al., 1989; Yhee et al., 2007; Sa'idu et al., 2016).

CONCLUSION

In conclusion, we found the presence of aspergillosis as 13,33% by histopathological and microbiological methods in geese which were brought to our department between 2013-2020 and underwent systemic necropsies. Based on these data, we concluded that aspergillosis is one of the most important infectious factors among goose deaths in Kars Region (Turkey). We think that it is important to inform the animal owners with confirmative diagnosis in order to prevent the disease and to eliminate economic losses in poultry.

ACKNOWLEDGEMENT

Ethical approval: The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experimental Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK-2020/155).

Conflict of interest: Authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Abbas, M.S., Yassein, S.N., & Khalaf, J.M. (2017). Isolation and identification of some important mycological isolates from dropping of birds in Baghdad. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3): 671-673.
- Aslan, Ö., Yaman, D., Karaca Bekdik, İ., Abay, S., & Ekebaş, G. (2015). Bir güvercin sürüsünde *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(2), 147-152.
- Beernaert, L.M., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F., & Martel, A. (2010). *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology*, 39(5), 325-331. doi: 10.1080/03079457.2010.506210
- Beyaz, L., Gümüşsoy, K.S., Çam, Y., Abay, S., & Atasever, A. (2008). Kayseri Hayvanat Bahçesi'nde bulunan bazı yabancı kanatlı türlerinde rastlanan sistemik *Aspergillozis*. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55(1), 31-35. doi: 10.1501/Vetfak_0000000292
- Beytut, E. (2007). Immunohistochemical diagnosis of *Aspergillus* in adult turkeys. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(2), 99-104.
- Beytut, E., Özcan, K., & Erginsoy, S. (2004). Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic *Aspergillus*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52(1), 71-84. doi: 10.1556/AVet.52.2004.1.8
- Cacciuttolo, E., Rossi, G., Nardoni, S., Legrottaglie, R., & Mani, P. (2009). Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Veterinary Research Communications*, 33(6), 521-527. doi: 10.1007/s11259-008-9199-7
- Della Vedova, R., Hevia, A., Vivot, W., Fernández, J., Córdoba, S.B., & Reynaldi, F.J. (2019). *Aspergillus* in domestic and wild birds from Argentina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 56(2), e152460. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.152460
- Fagbohun, E.D., Ayantola, K.J., & Toyin-Famoroti, A.J. (2020). Isolation and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* isolated from poultry birds in Ado-Ekiti, Nigeria. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 6(2), 31-44. doi:10.9734/ajb2t/2020/v6i230078
- Gautam, A.K., & Bhadauria, R. (2012). Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *African Journal of Biotechnology*, 11(104), 16814-16823.
- Gulcubuk, A., Erdogan-Bamac, O., Metiner, K., Ozturk Yuzbasioglu, G., Ozgur, Y., & Haktanir, D. (2018). A case of pulmonary aspergillosis in white storks. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(2), 1004-1009. doi:10.12681/jhvms.18021
- Hauck, R., Cray, C., & França, M. (2020). Spotlight on avian pathology: aspergillosis. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 49(2), 115-118. doi:10.1080/03079457.2019.1696946
- Latge, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310-350.
- Latif, H., Gross, M., Fischer, D., Lierz, M., & Usleber, E. (2015). Immunochemical analysis of fumigaclavine mycotoxins in respiratory tissues and in blood serum of birds with confirmed aspergillosis. *Mycotoxin Research*, 31(4), 177-183. doi: 10.1007/s12550-015-0228-4

- Leishangthem, G.D., Singh, N.D., Brar, R.S., & Banga, H.S. (2015).** Aspergillosis in avian species: a review. *Journal of Poultry Science and Technology*, 3(1), 1-14.
- Melo, A. M., Stevens, D. A., Tell, L. A., Veríssimo, C., Sabino, R., & Xavier, M. O. (2020).** Aspergillosis, avian Species and the one health perspective: the possible importance of birds in azole resistance. *Microorganisms*, 8(12), 2037. doi: 10.3390/microorganisms8122037
- McDougle, H. C., & Vaught, R. W. (1968).** An epizootic of aspergillosis in canada geese. *The Journal of Wildlife Management*, 32(2), 415-417.
- Nagano, Y., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., Walker, J. M., Elborn, J. S., Rendall, J., & Moore, J. E. (2008).** Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(6), 566-572.
- Okoye, J. O., Gugnani, H. C., & Okeke, C. N. (1989).** Pulmonary infections due to *Aspergillus flavus* in turkey poult and goslings. *Mycoses*, 32(7), 336-339. doi:10.1111/j.1439-0507.1989.tb02254.x
- Özmen, Ö., Şahinduran, S., Halgür, M., & Albay, M.K. (2007).** Devkuşlarında pulmoner aspergilloziste patolojik bulgular ve tedavi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(1), 1-4.
- Sa'idu, L., Ahmad, M. T., Sambo, S. J., Aliyu, H. B., Musa, I. W., & Wakawa, A. M. (2016).** Outbreak of aspergillosis in a flock of geese in Zaria, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 14(3), 62-66. doi:10.4314/sokjvs.v14i3.10
- Savelieff, M. G., Pappalardo, L., & Azmanis, P. (2018).** The current status of avian aspergillosis diagnoses: Veterinary practice to novel research avenues. *Veterinary clinical pathology*, 47(3), 342-362. doi:10.1111/vcp.12644
- Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., de Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J., & Verweij, P. E. (2015).** *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical mycology*, 53(8), 765-797. doi: 10.1093/mmy/myv067
- Shoukat, S., Wani, H., Jeelani, R., Ali, U., & Ali, M. (2018).** An overview of avian aspergillosis. *International Journal of Avian & Wildlife Biology*, 3(3), 222-223. doi:10.15406/ijawb.2018.03.00088
- Şahin, M., Aydın, F., Genç, O., & Güler, M. A. (1997).** Kazlardan *Aspergillus fumigatus* izolasyonu ve identifikasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 19-23.
- Tell, L.A. (2005).** Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, 43 Suppl 1, S71-S73. doi: 10.1080/13693780400020089
- Tell, L. A., Burco J. D., Woods L., & Clemons K. V. (2019)** Aspergillosis in Birds and Mammals: Considerations for Veterinary Medicine. In: Gupta A., Singh N. (Eds.), *Recent Developments in Fungal Diseases of Laboratory Animals* (49-72). Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18586-2_4
- Timurkaan, N., Eroksuz, H., Ongor, H., Cevik, A., Karabulut, B., Toraman, Z. A., Eroksuz, Y., & Incili, C.A. (2017).** Concurrent occurrence of lower respiratory aspergillosis and pneumoconiosis in a turkey flock, *Acta Veterinaria-Beograd*, 67(4), 562-571. doi:10.1515/acve-2017-0044
- Türkütanıt, S. S. (1999).** Kazlarda pulmonal aspergilloz. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 49-52.
- Ulloa, J., Cubillos, V., Montecinos, M. I., & Alberdi, A. (1987).** Aspergilosis en ganso silvestre (*Chloëphaga poliocephala* scl., 1857) en Chile [Aspergillosis in wild geese (*Chloëphaga poliocephala* scl., 1857) in Chile]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 34(1), 30-35. doi: 10.1111/j.1439-0450.1987.tb00367.x
- Yhee, J. Y., Kim, K. T., Yu, C. H., Kim, J. H., Cho, S. W., Lyoo, Y. S., Kim T. J., & Sur, J. H. (2007).** Histopathological diagnosis of avian tuberculosis and aspergillosis in a snow goose. *Korean Journal of Veterinary Research*, 47(4), 443-447.
- Ziolkowska, G., & Tokarzewski, S. (2007).** Occurrence of moulds in reproductive goose flocks Southern-eastern Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, 553-561.
- Ziolkowska, G., Tokarzewski, S., & Nowakiewicz, A. (2014).** Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. *Poultry Science*, 93(5), 1106-1112. doi:10.3382/ps.2013-03702

Koç spermasının kısa süreli saklanması katkı maddelerinin etkisi

Effect of additives on short-term storage of ram semen

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, kısa süreli saklanan koç spermasının (24 saatlik aralıklarla) 72 saate kadar spermatolojik parametreler üzerine etkilerini araştırmaktır. Çalışmada % motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü verileri değerlendirildi. Çalışmada her koçtan (4 baş Merinos koçu) alınan dört ejakülat kullanıldı. Ejakülatlar pooling yapıldıktan sonra eşit hacimli yedi parçaya bölündü. Çalışma grupları, tris bazlı sulandırıcıya eklenen resveratrol (2 ve 4 mM), troloks (2 ve 4 mM), BSA (3 ve 6 mg/ml) ve kontrol olmak üzere oluşturuldu. Sulandırılan örnekler 72. saate kadar 4°C de muhafaza edildi. Spermatozoa motilitesi, canlılık ve akrozom bütünlüğü 0, 24, 48 ve 72. saatte değerlendirildi. Motilite muayenesi faz kontrast ataçmanlı mikroskopta 400X lük büyütmede, canlılık ve akrozom bütünlüğü ise floresan mikroskop ile değerlendirildi. Çalışmanın 72. saatinde, BSA (3 ve 6mM) grupları motilite (53,75±2,50%; 55,00±4,08%) ve akrozom bütünlüğü (53,70±3,39%; 57,10±4,68%) değerlendirmelerinde kontrol grubu (43,75±2,50%; 46,53±3,58) ile istatistiksel farklılık (p<0,05) gösterdi. Troloks (4mM) grubunda (67,22±3,71%), tüm gruplara kıyasla 72. saatte en yüksek canlılık sonucuna ulaşılmış ayrıca kontrol grubu (46,53±3,53) ile istatistiksel farklılık (p<0,05) belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda koç sperma sulandırıcısına eklenen BSA ve troloksun koç spermasının kısa süreli saklamasında faydalı olduğu ve spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BSA, kısa süreli saklama, trehaloz, troloks

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of short-term stored ram semen (24-hour intervals) on spermatological parameters up to 72 hours. In the study, % motility, viability and acrosome integrity were evaluated. In this study four ejaculates from each ram (four merino rams) were used. The ejaculates were divided into seven equal-sized pieces after pooling. The study groups were formed as resveratrol (2 and 4 mM), trolox (2 and 4 mM), BSA (3 and 6 mg/ml) and control added to tris-based diluent. Diluted samples were stored at 4 °C until 72 hours. Spermatozoa motility, viability and acrosome integrity were evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours. Motility examination was evaluated with phase contrast microscope at 400X magnification, vitality and acrosome integrity were evaluated with fluorescent microscope. At the 72nd hour of the study, the BSA (3 and 6mM) groups were assessed for motility (53,75 ± 2,50%; 55,00 ± 4,08%) and acrosome integrity (53,70 ± 3,39%; 57,10 ± 4,68%) in the control group (43,75 ± 2,50%; 46,53 ± 3,58%) and statistical difference (p <0,05). In the Trolox (4mM) group (67,22 ± 3,71%), the highest viability was achieved at 72 hours compared to all groups, and a statistical difference (p <0,05) was determined with the control group (46,53 ± 3,53). As a result of the study, it was determined that BSA and trolox added to ram semen extender were beneficial in the short-term storage of ram semen and had a protective effect on spermatological parameters.

Keywords: BSA, short term storage, trehalose, Trolox

How to cite this article

Öztürk, C., Dursun Ş., Bulut, G., Kardeşin T. (2021). Effect of additives on short-term storage of ram semen. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 22-28. <https://doi.org/10.31797/vetbio.833211>

Research Article

Caner ÖZTÜRK^{1a}

Şükrü DURSUN^{2b}

Gaye BULUT^{2c}

Tahir KARAŞAHİN^{3d}

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine Aksaray University, Aksaray, Turkey

²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

³Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

ORCID-

^a[0000-0003-0566-0684](https://orcid.org/0000-0003-0566-0684)

^b[0000-0002-2453-3464](https://orcid.org/0000-0002-2453-3464)

^c[0000-0003-4500-1958](https://orcid.org/0000-0003-4500-1958)

^d[0000-0003-2358-0389](https://orcid.org/0000-0003-2358-0389)

Correspondence

Caner ÖZTÜRK

canerozturkvt@gmail.com

Article info

Submission: 13-12-2020

Accepted: 23-03-2021

Online First: 07-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



GİRİŞ

Suni tohumlama uygulaması, evcil hayvanlarda genetik ıslah için en yaygın ve etkili yetiştirme tekniğidir. Koçlarda, spermanın soğutularak kısa süreli saklanması, dondurulmuş-çözülmüş spermadan daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Koç spermasının dondurularak saklanması, soğutma ile karşılaştırıldığında sperma motilitesini, canlılığını ve fertilitate yeteneğini olumsuz etkilemektedir (O'Hara vd., 2010; Mata-Campuzano vd., 2014). Bununla birlikte, tohumlama için soğutularak saklanan spermanın etkili kullanımı, depolama süresinin artmasıyla motilite, membran ve akrozom bütünlüğünün azalması nedeni ile birkaç gün ile sınırlıdır (Gürler vd., 2016; Ledesma vd., 2016).

Bu hasarlar antioksidan sistemlerin değişmesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasının sonucudur (Bilodeau vd., 2001; Said vd., 2010). ROS genellikle oksidatif fosforilasyondaki enzimatik reaksiyonlar sırasında açığa çıkar ve bu enzimatik reaksiyonlar hücrenin enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için gerekmektedir (Valko vd., 2007; Tremellen, 2008). Spermatozoadaki yüksek oksidatif stres, plazma membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açar ve bu da sperm morfolojisinde değişikliklerin sebebidir (da Silva Maiavd., 2010).

Sperm ve seminal plazmadaki antioksidan sistem ROS'u temizlemek için yeterli değildir. Koç sperma sulandırıcılarına uygun antioksidanların eklenmesi, oksidatif stresi azaltmaya ve soğutarak saklama sırasında spermatozoayı ROS'tan korumaya katkıda bulunmaktadır (Bucak ve Tekin, 2007; Sarıözkan vd., 2009).

Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) kırmızı üzümün kabuğundan elde edilen antiproliferatif ve antioksidan özellikte

bir fitoaleksindir. Resveratrol inflamatuvar olaylarda düzenleyici rol oynar ayrıca antioksidan özelliğinin yanında lipit ve lipoprotein metabolizmasında düzenleyici etkisi bulunmaktadır. (Jang vd., 1997, Uguralp vd., 2005). Sulandırıcılara resveratrol eklenmesi, ROS üretimini azaltmak ve çözüm sonrası sperma antioksidatif savunma sistemini iyileştirmek için aktive edilmiş protein kinaz fosforilasyonunu teşvik etmektedir. Bu lipid peroksidasyonunu azaltarak spermatozoayı ROS hasarına karşı korumaktadır (Zhu vd., 2019).

Troloks (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) vitamin E nin suda çözünür analogudur (Giulivi ve Cadenas,1993). Hücre geçirgen ve suda çözünen bir antioksidan olan troloks oksidatif stres ve apoptozise karşı koruyucu özellik göstermektedir (Minaei vd., 2012). Troloks'un insan sperması üzerine yapılan çalışmalarda çözüm sonu bazı spermatolojik parametrelerde olumlu etki gösterdiği bildirilmektedir (Taylor vd., 2009; Minaei vd., 2012).

Sığır serum albümini (BSA), yüksek üretim maliyetleri ve karmaşık üretim teknolojisi gerektiren yaygın bir sperma koruyucu ajandır. Çalışmalar, BSA'nın plazma membranında ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini ve plazma zarını etkin bir şekilde koruyabildiğini bildirmiştir (Zhang vd., 2015; Diaz-Jimenez vd., 2018).

Sulandırılmış ve soğutulmuş koç sperması, eğer tohumlama kısa bir süre içinde yapılacaksa, dondurulmuş spermaya alternatif bir seçenektir. Bunun nedeni sperma hücresi üzerine zarar verici etkiler bu yöntemde dondurulmuş çözülmüş spermaya göre daha düşük seviyede gözlenmektedir. Sunulan çalışmanın amacı, 4 ° C'de 72 saat süre ile saklanan sperma üzerine sulandırıcıya eklenen katkı maddelerinin koç sperma parametreleri üzerindeki etkisini araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Hayvanlar ve spermanın alınması

Bu çalışmada 4 baş yetişkin Merinos koçtan (3 yaşlı) alınan sperm örnekleri kullanılmıştır. Aksaray ilinde yetiştiriciye ait koçlar kullanılmıştır. Hayvanlar sağlıklı ve tek tip optimal şartlarda beslenmeye tabi tutulmakta idi. Ejakülatlar haftada iki kez suni vajen yardımı ile toplanmıştır.

Spermanın sulandırılması

Sperma örnekleri 4 tekrarlı olarak toplandı. Ejakülatlardan en az %70 motilite ve ml de 2×10^9 spermatozoa olanlar kullanıldı. Sperma sulandırıcısı olarak Tris bazlı sulandırıcı (297.58 mM tris, 82.66 mM fruktoz, 96.32 mM sitrik asit, %15 yumurta sarısı, pH: 6.8) kullanıldı. Hayvanlardan alınan ejakülatlar yedi eşit parçaya bölündü ve 37°C 'de resveratrol (2ve 4 mM), troloks (2 ve 4 mM), BSA (3 ve 6 mg/ml) ve kontrol (katkı maddesi kullanılmayan) içeren sulandırıcılar ile sulandırıldı.

Motilite muayenesi

Sperma motilite muayenesi için, az miktarda sperma 37°C 'de tutulan bir su banyosunda değerlendirme için 10 dk dengelendi. Sperma motilite muayenesi 37°C 'deki ısıtma tablası bulunan faz kontrast ataçmanlı mikroskopta 400x lük büyütme ile subjektif olarak yapıldı. Lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesi en az 5 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması (%) motilite oranı olarak kaydedildi.

Sperm canlılığı

Sperma canlılığı Gungor vd. (2017) nin yöntemi ve SYBR-14 / PI Moleküler Prob: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA kullanılarak belirlendi. Sperma Tris stok solüsyonu ile 1:3 oranında seyreltildi ardından 30 µl seyreltilmiş sperma 6 µl SYBR-14 ve 2.5 µl PI ile karıştırıldı. Örnek hafifçe karıştırıldı, karanlıkta 37°C 'de 20

dakika inkübe edildi ve işlemi sonlandırmak için 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Lam üzerine 2.5 µl 'lik bir numune damlatılarak lamel ile kapatıldı. En az 200 sperma hücresi canlılığı değerlendirmek için floresan mikroskop altında 400 büyütmede incelendi. Kırmızı renk alan hücreler ölü, yeşil renk ise canlı olarak kabul edildi.

Akrozom bütünlüğü

Sperm akrozom bütünlüğü, Arachis hypogaea (L7381 FITC-PNA, Invitrogen) ile ve Gungor vd. (2017) tarafından belirlenen yöntemle değerlendirildi. Sperma örneklerinden 60 µl, 10 µl FITC-PNA ve 2.5 µl PI ile karıştırıldı. Örnekler karanlıkta 37°C 'de 20 dakika inkübe edildi ve işlemi sonlandırmak için 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Sperm akrozom bütünlüğünü belirlemek için floresan mikroskop (Carl Zeiss Axioscope 5) altında 400 x büyütmede en az 200 hücre incelendi. Parlak yeşil renk veren sperm hücrelerinin hasarlı olduğu kabul edilirken, boyamamış kırmızı renkli olanlar bozulmamış olarak kabul edildi.

Veri analizi

Elde edilen değerlerin önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata ortalaması (ortalama \pm SEM) olarak sunuldu. Tüm sonuçlar varyans analizine (ANOVA) göre ve Duncan'ın gruplar arasındaki farklarına göre analiz edildi. Sonuçlardan $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 21 paket programı ile yapıldı.

BULGULAR

Gruplar arası saatlere göre motilite (%) değerleri incelendiğinde 0. Saatte istatistiksel bir farklılık görülmez iken 24. saatte troloks (2mM), 48 ve 72. saatlerde BSA (6mg/ml) kontrol grubu ile istatistiksel farklılık ($p < 0,05$)

Koç spermasının saklanması

göstererek en yüksek koruyucu etkili grup olmuştur (Tablo 1). Tablo 2 de belirtildiği gibi sperma canlılık değerleri incelendiğinde en iyi koruyucu etkiyi tüm saatlerde troloks (2mM) grubu sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar 24. Saatten itibaren istatistiksel olarak kontrol grubu ile farklılık ($p<0,05$) göstermektedir.

Akrozom bütünlüğü yönünden gruplar karşılaştırıldığında (Tablo 3) 0. saatte gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmez iken diğer saatlerde BSA 6 mg/ml grubu kontrol grubu ile istatistiksel farklılık oluşturacak düzeyde en yüksek koruyucu etki gösteren grup olmuştur.

Tablo 1. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için motilite değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	82,50±5,00	75,00±4,08 ^{ab}	55,00±4,08 ^c	48,75±2,50 ^{bc}
Resveratrol 4 mM	80,00±4,08	72,50±2,89 ^{ab}	58,75±2,50 ^{bc}	45,00±4,08 ^{bc}
Troloks 2 mM	83,75 ±2,50	76,25±2,50 ^a	62,50±2,89 ^{ab}	51,25±4,79 ^{ab}
Troloks 4 mM	81,25 ±2,50	71,25±2,50 ^{ab}	61,25±4,79 ^{ab}	52,50±6,45 ^a
BSA 3 mg/ml	85,00±4,08	72,50±2,89 ^{ab}	65,00±4,08 ^a	53,75±2,50 ^a
BSA 6 mg/ml	85,00±2,87	73,75±2,50 ^{ab}	66,25±2,50 ^a	55,00±4,08 ^a
Kontrol	77,50±2,89	70,00±4,08 ^b	53,75±2,50 ^c	43,75±2,50 ^c
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

Tablo 2. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için canlılık değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	82,83±2,02	71,30±5,54 ^b	63,83±4,32 ^b	52,53±4,82 ^b
Resveratrol 4 mM	83,40±1,32	76,23±4,71 ^{ab}	68,00±3,72 ^b	62,03±5,11 ^a
Troloks 2 mM	83,37±3,38	73,38±3,02 ^{ab}	63,75±2,02 ^b	55,25±0,93 ^b
Troloks 4 mM	84,63±0,84	79,13±1,87 ^a	73,20±1,68 ^a	67,22±3,71 ^a
BSA 3 mg/ml	84,20±1,53	78,55±2,16 ^a	72,95±1,66 ^a	65,08±1,62 ^a
BSA 6 mg/ml	84,30±2,94	78,15±2,38 ^a	73,12± 3,30 ^a	66,73±3,56 ^a
Kontrol	82,07±1,56	70,98±4,51 ^b	63,40±4,19 ^b	49,12±4,93 ^b
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

Tablo 3. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için akrozom bütünlüğü değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	77,30±4,64	64,75±5,40 ^{ab}	54,53±2,63 ^{ab}	53,02±0,88 ^{bc}
Resveratrol 4 mM	76,90±1,61	66,98±6,55 ^{ab}	54,65±2,72 ^{ab}	51,08±3,37 ^{bc}
Troloks 2 mM	79,73±2,18	67,58±6,25 ^{ab}	56,20±2,52 ^{ab}	53,18±3,94 ^{ab}
Troloks 4 mM	77,43±2,86	65,30±3,60 ^{ab}	55,90±2,56 ^{ab}	52,68±2,22 ^{ab}
BSA 3 mg/ml	79,63±2,21	66,85±2,03 ^a	56,70±5,57 ^{ab}	53,70±3,39 ^{ab}
BSA 6 mg/ml	81,60±1,67	72,03±3,80 ^{ab}	60,50±6,58 ^a	57,10±4,68 ^a
Kontrol	77,10±4,43	62,03±5,21 ^b	51,28±3,72 ^b	46,53±3,53 ^c
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon ve sperm-oosit füzyonuna aracılık eden hücreler arası sinyal sistemleri fizyolojik rol oynar (Baumber vd., 2003). Bununla birlikte, spermatozoa tarafından aşırı ROS üretimi plazma zarına zarar verir ve böylece sperm hareketliliği, metabolik aktivite ve canlılık azalır (Ball vd., 2001).

Sunulan çalışmada, sulandırıcıya eklenen BSA ve troloksun kısa süreli saklama sırasında motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü parametrelerini koruyucu yönde etkilediği görülmüştür.

Sığır serum albüminin (BSA) koç sperması donma-çözülme sonu sperma motilitesi, plazma membran ve akrozomu bütünlüğünü üzerine koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (Uysal ve Bucak, 2007). Çalışmamızda spermatolojik parametreler üzerine BSA gruplarının koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Benzer şekilde araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, koç (Matsuoka vd., 2006) ve bufalo (El-Kon, 2011) sperması üzerine BSA'nın spermatolojik parametreleri koruduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak Sarıözkan vd., (2013) yaptıkları çalışmada tavşan spermasında BSA eklenen sulandırıcının ilk 48 saatte kontrol ile karşılaştırıldığında motilite değerinde kontrol grubu ile farklılığa rastlanmamış ($p > 0,05$), 72 saatte ise benzer şekilde faydalı bulunmuştur. Sunulan çalışma ile önceki çalışmalar benzer sonuçlar göstermiştir.

Troloks, suda çözünürlüğe sahip bir E vitamini (α tocopherol) türevidir ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilir (Mata-Campuzano vd., 2014). Önceki çalışmalarda Troloks un, fizyolojik sıcaklıklarda nispeten uzun inkübasyonlarda bile radikal bir temizleyici olarak yüksek bir etkinliğe sahip olduğu (Domínguez-Rebolledo vd., 2009) ve koç sperması kriyoprezervasyonu için olumlu sonuçlar veren önemli bir katkı maddesi olduğu

(da Silva Maia vd., 2010) belirlenmiştir. Troloks'un insan sperması üzerine yapılan çalışmalarda çözüm sonu bazı spermatolojik parametrelerde olumlu etki gösterdiği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Taylor vd., 2009; Minaei vd., 2012). Sperma hücresinde ROS üretiminin büyük oranda sulandırıcı içerisinde ve dondurma çözündürme işlemleri sırasında gerçekleştiğini ve dondurma işlemi sırasında kullanılan troloks un oksidatif stres oluşumunu kontrol edici özelliği olduğu belirtilmektedir (da Silva Maia vd., 2010). Troloksun koç spermasında kinematik parametreleri, plazma ve mitokondriyal yapıyı koruduğu Silva vd. (2013), domuzlarda sperma kalitesini arttırdığı Brzezińska-Ślebodzińska vd. (1995), çözüm sonu motilite ve mitokondriyal membran potansiyelini üzerine pozitif etkisi olduğu Peña vd. (2003) tarafından belirtilmiştir.

Resveratrol, in vitro koşullarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlevi göstermektedir. Resveratrol'in in vivo antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini artırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada in vivo antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürekliliğini de sağlamaktadır (De La Lastra ve Villegas, 2007). Resveratrolün insan spermasında oksidatif stresi azalttığı, motiliteyi arttırıp membran bütünlüğünü koruduğu Garcez vd. (2010), DNA hasarını düşürdüğü Branco vd. (2010), sağlıklı ratlara motilite ve anormal sperma oranı üzerine etkisi olmadığını Ourique vd. (2013), tarafından belirtilmiştir. Sunulan çalışmamızda resveratrol grupları kontrol grubu ile farklılık oluşturmamış ve 72. saatte koç sperması üzerine koruyucu etki göstermediği görülmüştür. Kısa süreli olarak saklanan aygır sperması incelemesinde resveratrol grubunun motilite, SYBR-PI ve FITCH-PI oranlarında kontrol grubuna kıyasla daha iyi koruyuculuk göstermiştir Giaretta vd.

(2014). Sunulan çalışma ile farklı sonuçlar oluşmasının doz farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sunulan çalışmada, sperma sulandırıcısına eklenen resveratrol, troloks ve BSA'nın kısa süreli saklanan koç sperması üzerine motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü parametrelerinde koruyucu etki gösterdiği belirlendi. Çalışma sonunda 72. saatte motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü için en yüksek koruyuculuğa BSA (6 mg/ml) grubunda ulaşılmıştır.

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan çalışma için Etik Kurul izni alınmıştır (Tarih/No: 2018/441).

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., & Baumber, J. (2001).** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, 56(4), 577-589.
- Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., & Ball, B. A. (2003).** Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 60(7), 1239-1247.
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001).** Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010).** Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235-237.
- Brzezińska-Ślebodzińska, E., Ślebodziński, A. B., Pietras, B., & Wieczorek, G. (1995).** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological trace element research*, 47(1-3), 69-74.
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007).** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108.

- da Silva Maia, M., Bicudo, S. D., Sicherle, C. C., Rodello, L., & Gallego, I. C. S. (2010).** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 118-123.
- De La Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007).** Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1156-1160.
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera R., Mari G., Mislei B., Love C. C., & Hidalgo, M. (2018).** Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal reproduction science*, 189, 103-109.
- Domínguez-Rebolledo, Á. E., Fernández-Santos, M. R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Garde, J. J., & Martínez-Pastor, F. (2009).** Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology*, 72(8), 1073-1084.
- El-Kon, I. (2011).** Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 11(4), 495-502.
- Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010).** Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and sterility*, 94(6), 2118-2121.
- Giaretta, E., Bucci, D., Mari, G., Galeati, G., Love, C. C., Tamanini, C., & Spinaci, M. (2014).** Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen? *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11-12), 1307-1312.
- Giulivi, C., & Cadenas, E. (1993).** Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(1), 152-158.
- Gungor, S., Ozturk, C., & Omur, A. D. (2017).** Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. *Veterinarní medicína*, 62(5), 245-252.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016).** Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997).** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F., & Cesari, A. (2016).** Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal reproduction science*, 173, 35-41.

- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Uruña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-Pastor F., & Alvarez, M. (2014).** Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal reproduction science*, 151(3-4), 137-147.
- Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006).** Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 52(5), 675-683.
- Minaei, M. B., Barbarestani, M., Nekoonam, S., Abdolvahabi, M. A., Takzare, N., Asadi, M. H., Hedayatpour A., & Amidi, F. (2012).** Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(2), 99.
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010).** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541-549.
- Ourique, G. M., Finamor, I. A., Saccol, E. M., Riffel, A. P., Pês, T. S., Gutierrez, K., Gonçalves, P.B.D., Baldisserotto, B., Pavanato M. A., & Barreto, K. P. (2013).** Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*, 37, 31-39.
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2003).** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal reproduction science*, 78(1-2), 85-98.
- Said, T. M., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010).** Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), 456-462.
- Sarıözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Bilgen, A. (2009).** The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2), 134-138.
- Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M.M.P. (2013).** Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal reproduction science*, 137(1-2), 37-44.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009).** Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 18(2), 184-189.
- Tremellen, K. (2008).** Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3), 243-258.
- Uguralp, S., Usta, U., & Mizrak, B. (2005).** Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *European Journal of Pediatric Surgery*, 15(5), 333-336.
- Uysal, O., & Bucak, M. N. (2007).** Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383-390.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Zhang, X., Li, X., & Xia, L. (2015).** Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 263-269.
- Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A., Wu D., & Zeng, W. (2019).** Resveratrol improves boar sperm quality via 50AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-15.

Analysis of E-coded food additives in delicatessen product labels within the status of Halal food

Research Article

Serap Kılıç Altun^{1a}
Mehmet Emin Aydemir^{1b}

¹Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-4203-2508](https://orcid.org/0000-0002-4203-2508)

^b[0000-0002-5849-1741](https://orcid.org/0000-0002-5849-1741)

Correspondence

Mehmet Emin Aydemir
aydemiremin23@harran.edu.tr

Article info

Submission: 28-01-2021

Accepted: 23-03-2021

Online First: 07-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



ABSTRACT

The increase in the world population, technological developments and the increase in the demand for food have increased the use of food additives due to the increasing demand for ready and long-lasting foods. The sources of food additives and the way they are obtained are questioned by people primarily for religious reasons. Muslim societies do not consume certain foods and additives added to them due to their religious beliefs. The aim of this study is to identify those suspected to be halal among E-coded additives on meat product labels. Within the scope of the study the label information of the meat products on sale in 5 different markets in the city center of Şanlıurfa were examined. Food labels of 122 products from different brands were examined. We identified 12 different doubtful food additives on the labels of meat products, and 11 labels included 1 food additive defined as non-halal according to the standard. As the Muslim population is spreading all over the world and the need for Halal products is rapidly increasing, the Halal food industry is growing and the importance of proper Halal certification of food products is increasing. It is necessary to clarify the Halal status of food additives in order to meet Halal requirements.

Keywords: Food additives, non-halal, meat products

INTRODUCTION

The increasing need for food due to the rapid increase of the world population, the development of technology, and the increase in the tendency of people to ready and long-lasting foods with the change of food demand have increased the use of food additives. Food additives are used for different purposes in foods (Table 1). Food additives are defined by the Codex Alimentarius Commission as follows: "which is not used as food alone, whether it has nutritive value or not, is added to foods for technological purposes in manufacturing, processing, preparation, application, packaging, transportation, storage, or which become a direct or indirect component of foods or the characteristics of foods (Codex Stan, 2020). There are different opinions in the scientific community about the health effects of food additives. According to the opinion that advocates Food Additives, it is that food additives go through a very strict and serious approval process before they are put on the market and they are used far below the levels that can harm human health (Jain et al., 2015). The opposite view argues that scientific studies on the effects of using these substances together in all stages of food production are still insufficient (Eaton, 2016).

How to cite this article

Altun SK., Aydemir, ME. (2021). Analysis of E-coded food additives in delicatessen product labels within the status of Halal food. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 29-34. <https://doi.org/10.31797/vetbio.869983>

E-coded food additives

Table 1. Classification of food additives according to their purpose of usage (Özgen & Hazarhun, 2019; Ekşi, 2014)

Function	Purpose of usage
Acids and Acidity Regulators	Regulates acid and base balance in foods
Antioxidants	Provides the extension of the shelf life of foods
Colorants	Provides food coloring
Stabilizers	Provides density to foods
Emulsifiers	Allows mixing of two or more phases that do not interfere with each other
Bulking Agents	Increases the volume of foods without increasing their calorie value
Foaming Agents	Provides the formation or homogeneous distribution of the gas phase in liquids and solids
Gelling Agents	Provides the food to have a gel-like structure
Propellant Gases	Makes it easier for food to come out of its packaging
Embossing Agents	Makes dough rise
Preservatives	Prevents the rotting of foods due to microorganisms and extends the shelf life
Thickening Agents	Increases the resistance of food to fluidity
Antifoams	Prevents food from foaming
Flavor Enhancers	Increases the taste or odor in foods
Glazing Agents	Creates a shiny and protective coating on the outer surface of food
Flavors	Gives food a particular taste or smell
Humectants	Prevents food from drying out
Sweeteners	Keeps the food energy low
Anti-Caking Agents	Prevents particles in food from sticking to each other
Tracer Gases	Prevents food from being exposed to the atmosphere
Flour Treatment Agents	Improves flours' color

In order to standardize food additives, E-codes, the first letter of the word Europe, have been given to the European Union by countries (Verbruggen, 2002).

The sources of food additives and the way they are obtained are questioned by people primarily for religious reasons. Muslim societies do not consume certain foods and additives added to them due to their religious beliefs. The uncertainty of which raw materials the food is produced from poses an important problem for consumers with religious

sensitivity (Batu & Regenstein, 2014). Especially the food additives should be checked religiously (Küçüköner, 2011).

The word halal is an Arabic origin word which means 'not contrary to the rules of religion, not prohibited in terms of religion' in the dictionary of the Turkish Language Association (TDK, 2020). Halal food refers to foods that are allowed to be eaten and drunk in Islamic Jurisprudence. The purpose of these restrictions on nutrition brought by the Quran to Muslims is to protect people's health. Consumption of food products that will endanger people's health is considered as haram according to Islamic religious rules (Karaman, 2012). The Halal and Haram are understandable and in among two of them are doubtful (Jahangir et al., 2016). Food additives are considered halal as long as they do not affect human health negatively, as long as they are herbal or if they are obtained from animals that are halal to be eaten in accordance with religious rules, according to Islamic methods. It must not have been obtained from the prohibited substances mentioned in the Quran and Hadith-i Sharifs and must not be genetically modified (Özgen & Hazarhun, 2019; Çelen, 2008). The sources of food additives and the way they are obtained are questioned by people primarily for religious reasons. Muslim societies do not consume certain foods and additives added to them due to their religious beliefs. The uncertainty of which raw materials the food is produced from poses an important problem for consumers with religious sensitivity. Especially the food additives should be checked religiously. The word halal on food additives and foods has become a reason of preference for non-Muslim consumers in terms of hygiene and health (Baharuddin et al., 2015). For all these reasons, it is very important to have Halal certification, to inspect food companies by an impartial institution, to confirm that they are produced in accordance with halal standards and to provide a certificate

of halal (OIC/SMIIC, 2020). The official international standards body Standards and Metrology Institute for the Islamic Countries (SMIIC), the affiliated institution to the Organization of Islamic Cooperation (OIC), have released General Requirements for Food Additives and Other Added Chemicals to Halal Food (OIC/SMIIC, 2020). The halal status of some food additives was determined in this published general requirement standard. The aim of this study is to identify those suspected to be halal among E-coded additives on meat product labels.

MATERIALS and METHODS

This research is an observational descriptive study. In the study, the food group to be included in the research was determined, the labels of the products in the determined food group were examined, the E-codes on the food labels were listed and whether these E-coded additives are halal or not are classified. Within the scope of the study the label information of the meat products on sale in 5 different markets in the city center of Sanliurfa were examined. Food labels of 122 products from different brands were examined Figure1. The names of the brands whose labels are examined were not included in the study due to the ethical principles. In Figure 1, the number of products evaluated within the scope of the examined product groups are indicated.

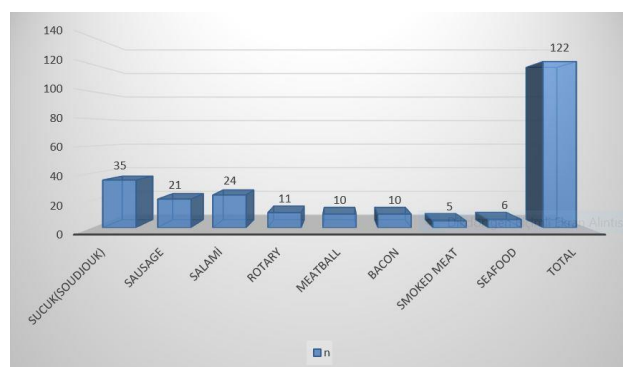


Figure 1. Distribution of samples by product groups

RESULTS

We identified 12 different doubtful food additives on the labels of meat products, and 11 labels included 1 food additive defined as non-halal according to the standard. The distribution of E-codes, which are considered as doubtful and nonhalal in the labels examined in our research, according to the product groups is given in Table 2.

Table 2. Product groups doubtful and nonhalal in the labels examined

Food group	Number of products	Number of doubtful products	Number of non-halal products
Beef meat products	66	63	4
Chicken meat products	30	30	4
Turkey meat products	20	20	3
Seafood products	6	5	0
Total	122	118	11

The distribution of E-codes in the labels examined in our research, according to the food additives is given in Table 3.

Table 3. Halal status of the food additives

E-Code	Number of products	Halal status
E-120	11	non-halal
E-126	1	not in standart
E-160	5	Doubtful
E-207	1	not in standart
E-223	1	not in standart
E-250	85	Doubtful
E-262	23	Doubtful
E-300	59	Doubtful
E-301	33	Doubtful
E-316	11	not in standart
E-318	3	not in standart
E-325	23	Doubtful
E-330	1	not in standart
E-331	5	Doubtful
E-407	12	Doubtful
E-412	2	Doubtful
E-415	2	Doubtful
E-450	16	not in standart
E-451	8	not in standart
E-452	75	not in standart
E-500	2	Doubtful
E-575	4	Doubtful
E-1400	8	not in standart
E-4500	1	not in standart

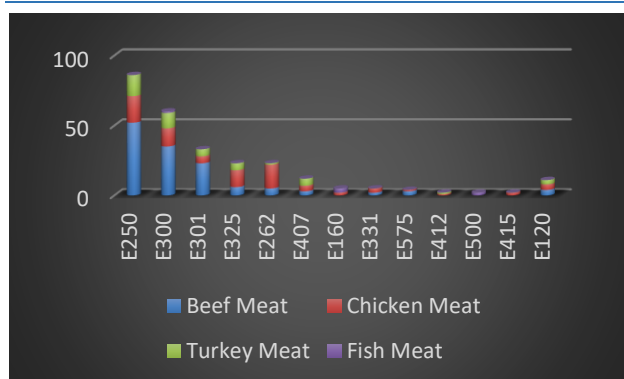


Figure 2. The distribution doubtful of E-codes according to the product groups.

The number of products with doubtful E-Codes is given in Table 4, Figure 2.

Table 4. Number of products with doubtful E-Codes

E-CODE	Beef Meat	Chicken Meat	Turkey Meat	See Food	All Products
E-250	52	19	15	0	86
E-300	35	13	11	1	60
E-301	23	5	5	0	33
E-325	6	12	5	0	23
E-262	5	17	1	0	23
E-407	3	4	5	0	12
E-160	0	2	0	3	5
E-331	2	3	0	0	5
E-575	3	1	0	0	4
E-412	0	1	1	0	2
E-500	0	0	0	2	2
E-415	0	2	0	0	2
E-120	4	4	3	0	11
TOTAL	133	83	46	6	268

DISCUSSION

The most common sodium nitrite coded E-250 in our study (n:85) is widely used as a preservative in meat products. Because it combines with the myoglobin in the meat and provides the formation of a bright pink-red color specific to the processed meats and the protection of this color. It also prevents the growth of *Clostridium botulinum* bacteria, which is very dangerous for human health. Besides these, it also has functions to prevent spoilage and stabilize the structure of the product. Unfortunately, many scientific studies have been carried out on its carcinogenic effect and its use has been prohibited in many

countries (Ma et al., 2018). Ascorbic acid with the code E-300, which is the most common in beef meat, is used as an acidity regulator in meat products. But synthetically produced ascorbic acid is dangerous for human health. E-160c (paprika extract) is the most common additive in seafood and it is obtained from the kernels and seeds of red peppers and can be mixed with gelatin; for this reason, its use as a food additive is prohibited in Australia. E-301, the sodium salt of ascorbic acid, also prevents nitrosamine formation in meat and is also used as an antioxidant, but its synthetic production is risky for public health. E-120 (Carmine) food additive, which is frequently used in meat and delicatessen products, is a controversial substance. Carmine derived from insects It is a food additive of animal origin since it is produced. It is free to use in Turkish food legislation and is considered non-halal according to the the Standards and Metrology Institute for Islamic Countries (SMIIC). This additive is stated on the halal Malaysia site to be non-halal only for those in the Hanafi fiqqah, and doubtful for others (OIC/SMIIC, 2020; Halal E-Codes, 2020) E-300, long name Ascorbic acid. This substance, which is found in many foods and beverages, is often labeled as vitamin C. Not the natural one, but the artificial one synthesized from glucose is considered suspicious and its health risks are discussed (Varvara et al., 2016). E-325 Sodium lactate used for its antimicrobial effect in foods is a risky food additive in young children with lactose intolerance, which is originally derived from milk but is considered suspicious because it may contain pig rennet (Aymerich et al., 2005). E-262 Sodium acetate or Sodium diacetate is widely used as acidity regulator in foods. However, in a study conducted in 2018, it was reported that rats showed lymphocytosis and even suppressed humoral parameters significantly, causing various pathological lesions (Abd-Elhakim et al., 2018).

As the Muslim population is spreading all over the world and the need for Halal products is rapidly increasing, the Halal food industry is growing and the importance of proper Halal certification of food products is increasing. It is necessary to clarify the Halal status of food additives in order to meet Halal requirements. There is great demand for clarification of questionable situations in food production, which can assist Muslim consumers with their religious obligation to ensure that food is Halal. Using raw materials and additives from Halal approved sources and using the appropriate technique will ensure the product to be Halal and create trust among consumers. The use of food additives, which may adversely affect human health as a result of the analysis of international food organizations and reliable laboratories, should be prohibited by the governments. This should be done for the purpose of protecting public health and not just for religious reasons.

CONCLUSION

Food additive lists of various institutions and organizations that issue halal certification around the world should be uniform. For this reason, food scientists and religious authorities should do more scientific work on the standardization of halal additives. Using systems such as listing and coding companies with halal food certification by the certification institutions whether the manufacturers have this certificate should be made clearly visible to the consumers. Because halal food is necessary not only for Muslims but also for all humanity in terms of health.

ACKNOWLEDGMENT

This study was presented as oral presentation at the 6th World Halal Summit on December 21-23, 2020 in İstanbul, Turkey.

Ethical approval: In this study, neither humans/animals nor any non-ethical objects

were not used for experimental or other scientific purposes.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest for this study.

REFERENCES

- Abd-Elhakim, Y. M., Hashem, M. M., Anwar, A., El-Metwally, A. E., Abo-El-Sooud, K., Moustafa, G. G., & Ali, H. A. (2018).** Effects of the food additives sodium acid pyrophosphate, sodium acetate, and citric acid on hemato-immunological pathological biomarkers in rats: Relation to PPAR- α , PPAR- γ and tnfa signaling pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 62, 98-106. doi:[10.1016/j.etap.2018.07.002](https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.07.002)
- Aymerich, T., Jofre, A., Garriga, M., & Hugas, M. (2005).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68(1), 173-177. doi:10.4315/0362-028X-68.1.173
- Baharuddin, K., Kassim, N.A., Nordin, S.K., & Buyong, S.Z. (2015).** Understanding the halal concept and the importance of information on halal food business needed by potential Malaysian entrepreneurs. *International Journal Of Academic Research In Business And Social Sciences*, 5(2), 170-181. doi:10.6007/IJARBS/v5-i2/1476
- Batu, A., & Regenstein, J. M. (2014).** Halal food certification challenges and their implications for muslim societies worldwide. *Electronic Turkish Studies*, 9(11), 111-130.
- Codex Stan. (2020, December 07)** General standards for food additives. <https://www.bsmi.gov.tw/wSite/public/Data/f1295594710650.pdf>
- Çelen, M. (2008).** Gıda katkı maddelerinin helal olma şartları. *1.uluslararası helal gıda konferansı bildiri kitabı*, 60-71.
- Ekşi, A. (2014).** Başlıca gıda katkıları ve kullanılma amaçları. M. Tayfur (Ed.) A'dan Z'ye gıda katkı maddeleri içinde (ss.52-75). Ankara: Detay yayıncılık.
- Eaton, B. (2020, December 04)** Food additives: Definition, history and debate. <https://bruceeatonphd.wordpress.com/2016/04/08/food-additives-definition-history-and-debate/>
- Halal E-Codes, (2020, December 05).** Malaysian Halal Consultation and Training. http://halalmalaysia.net/HALAL_E-CODES.php
- Jahangir, M., Mehmood, Z., Bashir, Q., Mehboob, F., & Ali, K. (2016).** Halal status of ingredients after physicochemical alteration (Istihalah). *Trends in Food Science & Technology*, 47, 78-81. doi:[10.1016/j.tifs.2015.10.011](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.011)
- Jain, A., & Mathur, P. (2015).** Evaluating hazards posed by additives in food a review of studies adopting a risk assessment approach. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 3(3), 243-255. doi:[10.12944/CRNFSJ.3.3.08](https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.3.08)

- Karaman, A. (2012).** Gıda Ürünlerinde Helal ve Haramı Belirleme Yöntemi. *C.Ü. İlahiyat Fakültesi Dergisi*, 16(1), 453-478.
- Küçüköner, E. (2011).** Helal gıda serti-fikasyonunda gıda katkı maddelerinin yeri. *1.Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı*, 12- 17.
- Ma, L., Hu, L., Feng, X., & Wang, S. (2018).** Nitrate and nitrite in health and disease. *Aging and Disease*, 9(5), 938. doi: [10.14336 / AD.2017.1207](https://doi.org/10.14336/AD.2017.1207)
- OIC/SMIIC. (2020).** General requirements for food additives and other added chemicals to halal food 24:2020.
- Özgen, I., & Hazarhun, E. (2019).** Gıda etiketlerindeki E-kodlu katkı maddelerinin helal gıda kapsamında incelenmesi. *Balikesir University Journal of Social Sciences Institute*, 22(41). doi:10.31795/baunsobed.580561
- TDK, (2020, December 05)** Halal word. <https://www.tdk.gov.tr/>
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., & Celano, G. V. (2016).** The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1). [10.4081 / ijfs.2016.4313](https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.4313)
- Verbruggen, R. (2002).** Avrupa Birliği'ndeki gıda katkı maddeleri. *Gıda Bilimi ve Teknolojisi, New York; Marcel Dekker*, 109-198.

Bir kedide fasiyal leiomyosarkom olgusu

Case of fascial leiomyosarcoma in a cat

ÖZET

Bu olgu sunumu ile bir kedideki fasiyal subkutanöz leiomyosarkomun histopatolojik tanısı, operatif işlemi ve postoperatif süreci hakkında bilgi verilmesi amaçlandı. Olgumuzu kliniğimize baş bölgesinde sağ kulağın altında fındık büyüklüğünde bir kitle şikâyeti ile getirilen 3 yaşında, chinchilla ırkı bir dişi kedi oluşturdu. Olgunun klinik muayenesinde sağ kulağın altında yaklaşık 2,5 cm çapında, elastik kıvamlı, yer yer hemorajik odakların olduğu bir kitle tespit edildi. Genel anestezi altında kitle total olarak eksize edildi. Olgunun postoperatif takibinde yaklaşık 4. ayda nüks şekillendiği ancak kedinin genel durumunun iyi olduğu ve yavru olduğu bilgisine ulaşıldı. Alınan doku örneklerinden hazırlanan kesitler hematoxilen-eozin ve Masson'un trikrom boyama tekniği ile boyandı. Histopatolojik incelemelerde, çeşitli yönlere kollar veren bantlar veya girdaplar yapmış oval veya iğ şeklinde atipik kas hücreleri görüldü. Masson'un trikrom boyamasında bu hücrelerin kırmızı renkte boyandığı dikkati çekti. Tüm bu değerlendirmelerin sonucunda kitle histomorfolojik olarak leiomyosarkom olarak tanımlandı. Bu sunum, kedilerde Leiomyosarkom'un nadirde olsa görülebileceğini ve olguların postoperatif dönemde nüks şekillenebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Cerrahi, fasiyal leiomyosarkom, histopatoloji, kedi

ABSTRACT

The aim of this case report was to give information about histopathological diagnosis, operative process and postoperative process of facial subcutaneous leiomyosarcoma in a cat. A 3-year-old chinchilla breed female cat was brought to our clinic with a complaint of a nut-sized mass under the right ear in the head area. A clinical examination of the case found a mass under the right ear with a diameter of about 2.5 cm, elastic consistency, hemorrhagic foci in places. In the postoperative follow-up of the case, it was found that recurrence was observed approximately in the 4th month, but the general condition of the cat was good and had kittens. The sections prepared from the tissue samples were dyed with hematoxylene-eosin and Masson's trichrome staining technique. Histopathological examinations showed atypical muscle cells in the form of oval or spindle shaped novelties that made bands or vortices that gave arms in various directions. In Masson's trichrome painting, it was noted that these cells were painted red. As a result of all these assessments, the mass was histomorphologically identified as leiomyosarcoma. This presentation shows that leiomyosarcoma can be seen in cats, although rare, and cases may relapse in the postoperative period.

Keywords: Surgery, fascial leiomyosarcoma, histopathology, cat

How to cite this article

Hayat, A., Yener, K., Yavuz, Ü., Yumuşak, N. (2021). Bir kedide fasiyal leiomyosarkom olgusu. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 35-38. <https://doi.org/10.31797/vetbio.839403>

Case Report

Ali Hayat^{1a}

Kerem Yener^{1b}

Ünal Yavuz^{1c}

Nihat Yumuşak^{2d}

¹Department of Surgery,
Faculty of Veterinary
Medicine, Harran University,
Şanlıurfa, Turkey

²Department of Pathology,
Faculty of Veterinary
Medicine, Harran University,
Şanlıurfa, Turkey

ORCID-

[*0000-0002-8597-0705](https://orcid.org/0000-0002-8597-0705)

[*0000-0002-6947-0356](https://orcid.org/0000-0002-6947-0356)

[*0000-0002-4981-2355](https://orcid.org/0000-0002-4981-2355)

[*0000-0002-9299-2902](https://orcid.org/0000-0002-9299-2902)

Correspondence

Kerem YENER

keremyener@harran.edu.tr

Article info

Submission: 11-12-2020

Accepted: 09-03-2021

Online First: 07-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0

International License



GİRİŞ

Leomiyosarkomlar düz kaslardan köken alan, kötü huylu, yavaş büyüyen ve lokal invaziv karakterdeki mezenşimal tümoral oluşumlardır. (Bock vd., 2007; Fews vd., 2008; Grosas vd., 2017). Derinin bağ doku ve dermis katmanlarından köken alan ve daha nadir görülen leomiyosarkomlara ise yüzeysel leomiyosarkomlar denilmektedir. Yüzeysel leomiyosarkomlar kutanöz ve subkutanöz leomiyosarkomlara ayrılmaktadır (Kim vd., 2014). Leomiyosarkomlar daha çok gastrointestinal sistemde ve dişi hayvanların genital organlarında gözlemlenirken daha az olarak da idrar kesesi, özefagus, ekstremitte bölgelerinde rapor edilmiştir (Movassaghi vd., 2008; Jung-Yeon vd., 2008; Kim vd., 2014;). Sunulan bu çalışma ile; bir kedide karşılaşılan ve görülme sıklığı düşük olan fasiyal subkutanöz leomiyosarkomun histopatolojik tanısı, operatif işlemi ve postoperatif süreci hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

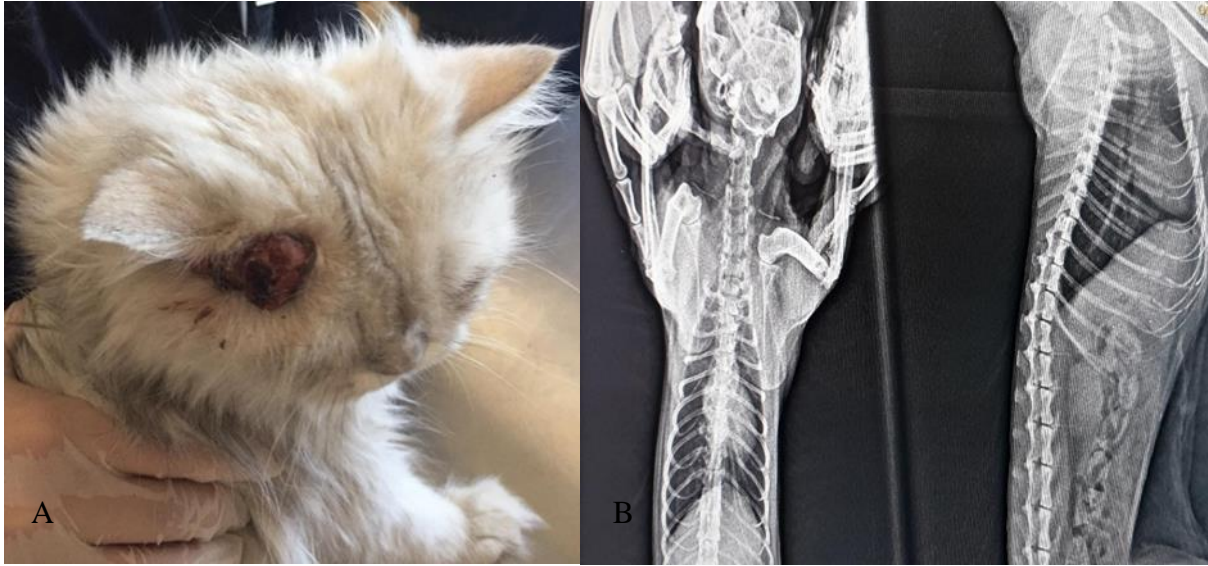
OLGU SUNUMU

Olgumuzu 3 yaşında, chinchilla ırkı, dişi bir kedi oluşturdu. Hasta sahibi tarafından sağ kulağın alt tarafında fındık büyüklüğünde sert bir kitle olarak fark edilen olgu herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadan, fark edilmesinden yaklaşık 1 ay sonra kliniğimize getirildi. Eşkal ve anamnez bilgileri kaydedilen kedide vücut ısısı, kapillar dolum zamanı, dakikadaki solunum sayısı ve dehidrasyon derecesi normal sınırlar içerisinde belirlendi. Yapılan klinik muayenede Şekil 1A da görüldüğü üzere orta sertlikte, yüzeysel ve yer yer hemorajik odakların olduğu 2.5 cm çapında bir kitle tespit edildi (Şekil 1A).

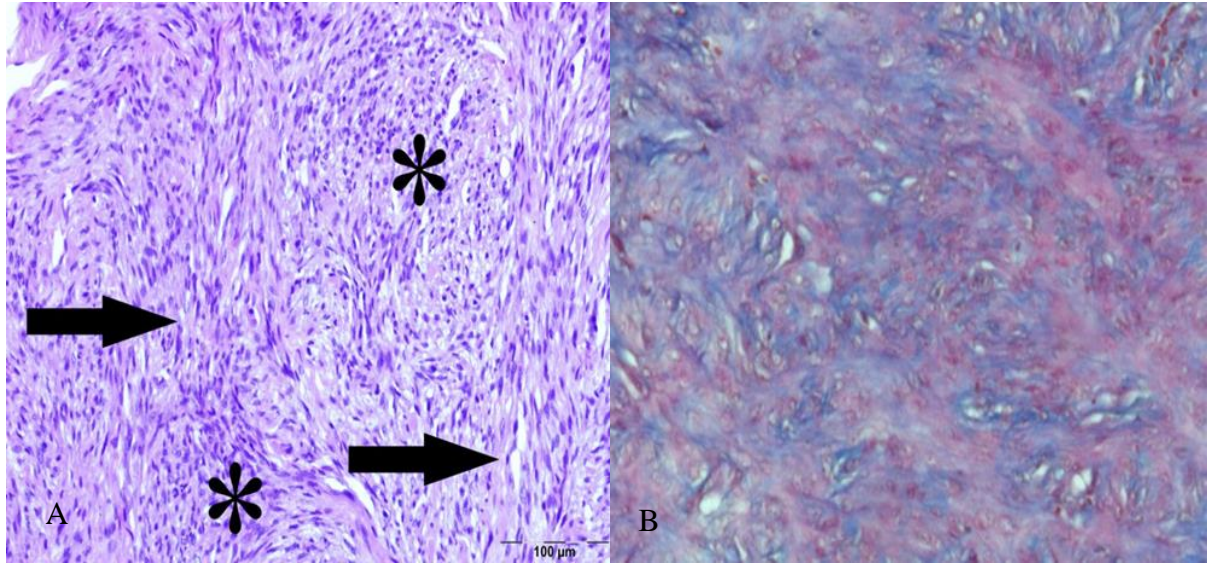
Tümoral kitle şüphesiyle alınan göğüs boşluğu radyografisinde Şekil 1B görüldüğü gibi herhangi bir metastatik bulguya

rastlanmadı (Şekil 1B). Hayvanın genel durumunun iyi olduğu göz önüne alınarak operasyona karar verildi. Preanestezik olarak Ksilazin HCl (Control® %10, Doğa İlaç, İstanbul, Türkiye) 35 mg/kg dozunda kas içi uygulandı. Bundan 15 dakika sonra tam bir anestezi sağlanması amacıyla ketamin hidroklorür (Ketasol® %10, İnterhas, Ankara, Türkiye) 20 mg/kg dozunda yine kas içi uygulandı. Bölgenin antisepsisi sağlandıktan sonra, kitle lokal olarak eliptik ensizyon yapılarak çevre dokularından küt diseksiyon ile uzaklaştırıldı. Operasyon sırasında kitlenin altındaki dokularda patolojik bir durumla karşılaşılmadı. Deri altı bağ doku ve deri kuralına uygun olarak 0 numara PGA iplik ile basit ayrı dikişlerle kapatıldı. Daha sonra kitle histopatolojik inceleme yapılması için %10'luk formalin içine alınarak patoloji laboratuvarına gönderildi. Makroskobik muayenede, kitlenin yaklaşık 2,5 cm çapında, yumuşak kıvamlı ve üzeri deriyle kaplı olduğu tespit edildi. Ayrıca bölgede geniş ülser alanları ile kanama gözlemlendi. Kitlenin kesit yüzünde boz-beyaz renkte ve yer yer kanama alanları mevcuttu. Histopatolojik değerlendirmede, çeşitli yönlere kollar veren bantlar veya girdaplar yapmış oval veya iğ şeklinde atipik kas hücreleri görüldü (Şekil 2A). Yapılan Masson'un trikrom boyamasında ise bu hücrelerin kırmızı renge boyandığı dikkati çekti (Şekil 2B). Ayrıca bu yapılar geniş kanama alanları ile çok sayıda yangısal hücre infiltrasyonları eşlik etmekteydi.

Postoperatif tedavide ampisilin/sulbaktam (Sulcid®, İ.E. Ulagay, Türkiye) kas içi olarak 20 mg/kg dozda 5 gün süreyle uygulandı. Postoperatif 2. ayda herhangi bir nüks şekillenmediği ve kedinin genel durumunun iyi olduğu gözlemlenirken, 4. ayın sonunda nüks şekillendiği ancak kedinin gebe kalarak yavruladığı bilgisine ulaşıldı.



Şekil 1A. Makroskobik olarak kedinin kulak bölgesindeki kitle. Şekil 1B. Kedinin L/L ve V/D pozisyonlarda akciğer radyografisi.



Şekil 2A. Girdaplar şeklinde dizilim gösteren tümör hücreleri; longitudinal (oklar) ve transversal (yıldızlar) hücre kesitleri (Hematoksilen-Eosin boyama). Şekil 2B. Trikrom boyamasında kırmızıya boyanan kas hücre demetleri, (Trikrom Boyama)

TARTIŞMA

Leomiyosarkomlar genellikle yüksek malign potansiyel taşıyan kötü prognozlu bir tümördür. Deri ve derialtı bağ dokularında meydana gelen subkutanöz leomiyosarkomlara oldukça nadir rastlanılmaktadır (Liu vd., 2003).

Cooper vd. (2002), deri ve deri altı bağ dokularından köken alarak gelişen sert subkutanöz tümörlerin hayvanlarda baş ve boyun bölgesinde geliştiğini bildirmişlerdir. Bu olguda da subkutanöz leomiyosarkom,

chinchilla ırkı dişi bir kedinin fasiyal bölgesinde sağ kulak altında tespit edilmiştir. Subkutanöz leomiyosarkom çok sık karşılaşılan bir lezyon olmadığı için hastalığın yaş, ırk ve cinsiyet yönünden predispozisyonu ve etiolojisi hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır (Labelle vd., 2010). Yapılan çalışmalarda (Bock vd., 2007; Fews vd., 2008) subkutanöz leomiyosarkom vakalarının daha çok erişkinlerde ortaya çıktığı bildirilmesine rağmen sunulan çalışmada subkutanöz

leomiyosarkom olgusu üç yaşındaki bir kedide tespit edilmiştir (Bock vd., 2007; Fews vd., 2008).

Bazı yazarlar (Fews vd., 2008; Jung-Yeon vd., 2008) subkutanöz tümörlerin insanlarda sıklıkla metastaza sebep olduklarını hayvanlarda ise nadir vakalarda metastaz yaptıklarını rapor etmişlerdir. Jacobsen vd. (2000) tarafından bir kedinin arka sağ bacağına 2. ve 3. phalanxlar arasında olduğu bildirilen subkutanöz leomiyosarkom olgusunun postoperatif altıncı ayda aynı bölgede nüks ettiği ve akciğerlere metastaz yaptığı bildirilmiştir. Bock vd. (2007) tarafından, bir kurtta sol karın bölgesinde büyük bir subkutanöz leomiyosarkom bildirilmiş ve bu olgunun postoperatif ikinci ayda aynı bölgesinde nüks meydana geldiği rapor edilmiştir. Jung-Yeon vd. (2008) ise 10 aylık bir hamsterde arka sağ bacakta tespit ettikleri subkutanöz leomiyosarkom olgusunda diyafram ve akciğer metastazına rastladıklarını bildirmişlerdir. Sunulan bu olguda da baş bölgesinde şekillenen subkutanöz leomiyosarkom, postoperatif dördüncü ayda aynı bölgede nüks göstermiş ancak torakal ve abdominal bölgeden alınan grafilere metastaz olgusuna rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak subkutanöz leomiyosarkomun genç chinchilla ırkı kedilerin baş bölgesinde nadiren de olsa karşılaşılabileceği görülmektedir. Nüks oluşumu göz önüne alınarak operatif müdahale yapılabilen bu vakalarda hasta sahibinin prognoz hakkında bilgilendirilmesi de gerekmektedir. Olgu klinisyen veteriner hekimlere yardımcı olacağı düşüncesi ile rapor edilmiştir.

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Bu çalışma 5th International conference on agriculture, animal husbandry and rural development, November 13-15, 2020 / Ankara, Turkey, 2020 de Sözlü olarak sunuldu.

Yazarlar, aralarında bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik beyan: Hasta sahibinden 25.12.2019 tarihli “aydınlatılmış onam formu” ile izin alınmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Bock, P., Seehusen, F., Müller, H., Aupperle, H., Hewicker-Trautwein, M., & Wohlsein, P. (2007).** Subcutaneous Leiomyosarcoma in a Captive European Wolf (Canis Lupus). *Veterinary Record*, 161, 429-430.
- Cooper, B.J., & Valentine, B.A. (2002).** In: *Tumors in Domestic Animals, 4th ed. pp. 319-363.*
- Fews, D., Scase, T.J., & Battersby, I.A. (2008).** Leiomyosarcoma of the Pericardium, with Epicardial Metastases and Peripheral Eosinophilia in a Dog. *Journal of Comparative Pathology*, 138, 224-228.
- Grosas, S., Østevik, L., Revold, T., Ottesen, N., & Ropstad, E. (2017).** Uveal Myxoid Leiomyosarcoma in a Horse. *Clinical Case Reports*, 5(11), 1811-1818.
- Jacobsen, M.C., & Valentine, D.B.A. (2000).** Dermal Intravascular Leiomyosarcoma in a Cat. *Veterinary Pathology*, 37, 100-103.
- Jung-Yeon, Y.I., Yeong-Hun, K.I.M., & Byung-II, Y.O.O.N. (2008).** Primary Subcutaneous Leiomyosarcoma of the Hamster Hind Leg. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(5), 517-520.
- Kim, S.H., Ji, A.R., Park, J.K., Kim, A.Y., Lee, E.M., Lee, E.J., Min, C.W., Kang, K.K., Lee, M.M., Sung, S.E., Hwang, M., Kwak, D.M., Kim, T.H., & Jeong, S.S. (2014).** Subcutaneous leiomyosarcoma in a Smad3+/- mouse. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(3), 420-422.
- Labelle, P., & Holmberg, B.J. (2010).** Ocular Myxoid Leiomyosarcoma in a Cat. *Veterinary Ophthalmology*, 13(1), 58-62.
- Liu, S.M., & Mikaelian, I. (2003).** Cutaneous Smooth Muscle Tumors in the Dog and Cat. *Veterinary Pathology*, 40, 685-692.

Sistemik inflamatuvar cevap sendromu ve muhtemel bakteriyel translokasyonu mevcut köpeklerde vital destekleyici yeni sağaltım: proktolizis ile yüksek hacimde polietilen glikol uygulaması

Vital-supporting new therapy in dogs with systemic inflammatory response syndrome and possible bacterial translocation: application of high-volume polyethylene glycol with proctolysis

ÖZET

Retrospektif vaka serisine ait çalışmada laboratuvar analizleri eşliğinde sistemik inflamatuvar cevap sendromu ile muhtemel bakteriyel translokasyonu mevcut köpeklerde, rektal enema (proktolizis) ile yüksek hacimde polietilen glikol uygulamasının bağırsak bariyerini yeniden inşası ile sepsisin durdurulması amaçlandı. Bu kapsamda farklı hastalıkları bulunan ve sistemik inflamatuvar cevap sendromu eşlik eden 8 farklı köpekte standart sağaltım protokolleri ile rektal yolla yüksek hacimde polietilen glikol uygulandı. Polietilen glikol uygulama öncesi 2-4 arası saptanan sistemik inflamatuvar cevap skorlarında 5 günlük uygulama sonrası 0-1 arasına düştüğü gözlemlendi. Bu yönü ile sınırlı sayıda olguda da olsa, kliniklerde sistemik inflamatuvar cevap sendromu ve sepsis durumlarında bu çalışmada bir ilk olduğu üzere rektal enema ile polietilen glikol kullanılabilirliği ortaya konulmuş olup herhangi bir yan etki saptanmaması yine tarafımızca olumlu karşılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, rektal enema, polietilen glikol, SIRS

ABSTRACT

In the study of retrospective case series, it was aimed to restrain of sepsis as reconstructing the intestinal barrier via high volume polyethylene glycol administration by rectal enema (proctolysis) in dogs being systemic inflammatory response syndrome with possible bacterial translocation accompanied by laboratory analysis. Regarding high volume polyethylene glycol was administered rectally with standard treatment protocols in 8 different dogs diagnosed different diseases and concomitant with systemic inflammatory response syndrome. It was observed to the systemic inflammatory response scores was 2-4 before the polyethylene glycol application, decreased 0-1 after 5 days of application. In this respect, the use of polyethylene glycol via rectal enema has been demonstrated as a first in this study in cases applied to clinics with systemic inflammatory response syndrome and sepsis and we have also received the absence of any side effects favorably although in a limited number of cases.

Keywords: Dog, rectal enema, polyethylene glycol, SIRS

How to cite this article

Ural, K., Erdoğan, H., Erdoğan, S., İcaçan, ŞG., Akbaş C. (2021). Vital-supporting new therapy in dogs with systemic inflammatory response syndrome and possible bacterial translocation: application of high-volume polyethylene glycol with proctolysis, 6(1), 39-44. <https://doi.org/10.31797/vetbio.834433>

Case Report

Kerem URAL^{1a}
Hasan ERDOĞAN^{1b}
Songül ERDOĞAN^{1c}
Şükran Gözde İÇAÇAN^{1d}
Cansu AKBAŞ^{1e}

¹Department of Internal, Medicine Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

ORCID-

^a[0000-0003-1867-7143](https://orcid.org/0000-0003-1867-7143)

^b[0000-0001-5141-5108](https://orcid.org/0000-0001-5141-5108)

^c[0000-0002-7833-5519](https://orcid.org/0000-0002-7833-5519)

^d[0000-0001-8195-4575](https://orcid.org/0000-0001-8195-4575)

^e[0000-0003-3954-6951](https://orcid.org/0000-0003-3954-6951)

Correspondence

Songül ERDOĞAN

songultp.09@gmail.com

Article info

Submission: 02-12-2020

Accepted: 13-04-2021

Online First: 24-04-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

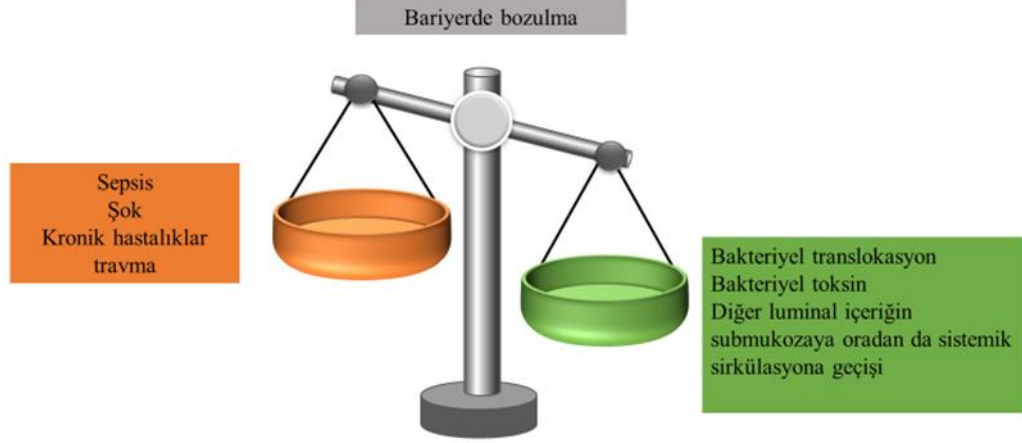
International License



GİRİŞ

Sağlıklı canlıda faydalı şekilde görevini gerçekleştiren bağırsak, bağırsak mikrobiyomu, intestinal

bariyer, hastalık durumlarından ve muhtemel sistemik inflamatuvar cevap sendromu (SIRS)' dan sorumlu bakteriyel translokasyon patogeneze katkı sunan durumlar Şekil 1'de paylaşılmıştır.



Şekil 1. Kritik hastaların çoğunda canlı bu şekilde kendi bakterilerinin emilmesi sonrası ölebilmektedir. Geleceğe bakış açısı sunabilme adına bariyerin fiziksel porsiyonunun polietilen glikol uygulaması ile koruma altına alınmasının ne kadar önemli olduğu bilinmektedir ki, bu görselden çıkarımda bulunulabilir (Wu vd., 2004; Valuckaite vd., 2013).

Retrospektif vaka serisine ait çalışmada laboratuvar analizlerine göre SIRS (ile muhtemel bakteriyel translokasyonu mevcut) belirlenen köpeklerde rektal enema (proktolizis) ile yüksek hacimde polietilen glikol (pEg) uygulamasının bağırsak bariyerini yeniden inşası ile sepsisin engellenmesi/ilerleyişinin durdurulması amaçlandı.

OLGU SUNUMU

Farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten etiyolojik tabanlı (detaylı laboratuvar analizleri ile veteriner iç hastalıkları alanına yönelik) değerlendirmede değişik hastalıklara ilişkin tanı konulan 8 köpekte eş zamanlı ko-morbidite SIRS tespit edilerek, hastalıklarına yönelik standart sağaltım protokollerine (sıvı sağaltımı, gastrokinetik, hepatoprototektif ve nutrasötik kullanımı) ilave olarak rektal enema (proktolizis) ile yüksek hacimli pEg uygulaması 5 gün süreyle yapıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada uygulanan Golytely (avicenna farma) oral çözelti için toz ve kompozisyonu

Ürün adı	Bileşim	Polietilen glikol	Yardımcı maddeler
Golytely (Avicenna Farma) oral çözelti için toz	4 lt çözelti	3350 236 g	Anhidrus sodyum sülfat 22,74 g
			Sodyum bikarbonat 6,74 g
			Sodyum klorür 5,86 g
			Potasyum klorür 2,97 g

Klinik muayene bulguları eşliğinde tanı ve sağaltım girişimi

Sistemik inflamatuvar cevap skorlarının değerlendirilmesinde ilgili kriterler (solunum frekansı > 20/dakika, kalp frekansı > 120/dakika, total lökosit sayısı (WBC) < 6 ya da > 16 x10⁹ L, rektal derece < 38.1°C ya da > 39.2°C)

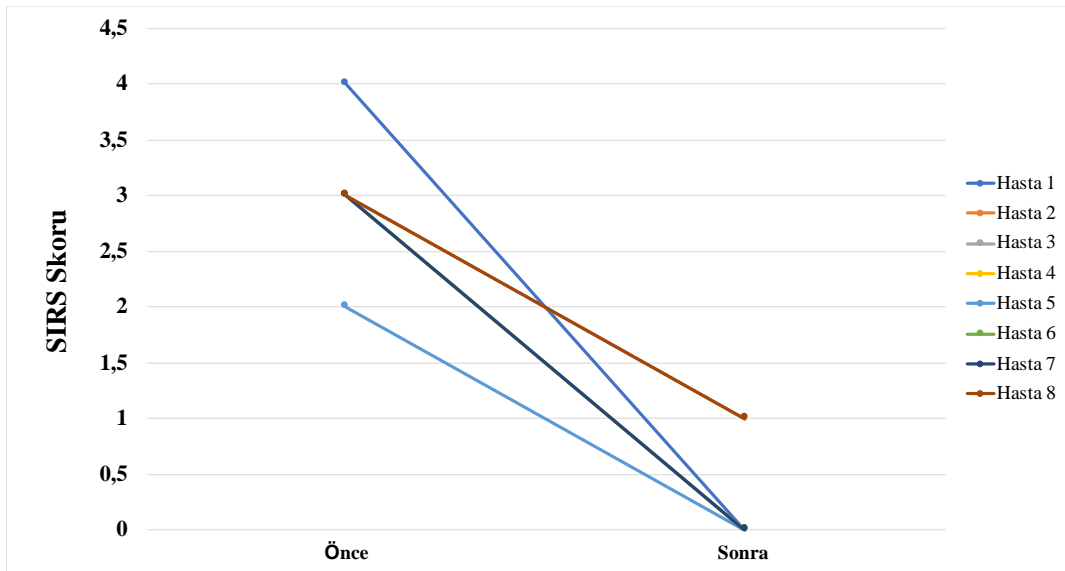
herhangi birisinin (1 er puan) saptandığı durumlarda Kilpatrick vd. (2016) yorumuna benzer şekilde 0 ile 4 arası değerimde değerlendirildi (Hauptman vd. 1997). Kalp ile solunum frekansı, rektal ısı, hematoloji ile serum biyokimyasal profili kayıt altına alındı. SIRS skorları Tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2. Çalışma kapsamına alınan olgulara ait demografik bilgilerle, SIRS skorları

Olgu serisi	Tanı	SIRS skoru	
		Öncesi	Sonrası
Olgu I	Gastrik ülserasyon	4	0
Olgu II	İnflamatuvar bağırsak hastalığı + pankreatitis	3	1
Olgu III	Kanine monositik ehrlichiozis	3	0
Olgu IV	Parvoviral gastroenteritis	3	0
Olgu V	Parvoviral gastroenteritis	2	0
Olgu VI	İnflamatuvar bağırsak hastalığı	3	0
Olgu VII	İnflamatuvar bağırsak hastalığı + diabetes mellitus	3	0
Olgu VIII	Parvoviral gastroenteritis	3	1

Polietilen glikol solüsyonu kullanımı sonrasında her 8 olguda sağaltım öncesi 2-4 arası saptanan

SIRS skorları 5 günlük uygulama sonrası 0-1 arasında saptandı (Şekil 2).



Şekil 2. pEg solüsyonu uygulama öncesi ve sonrasına göre olguların SIRS skorlarının grafiksel dağılımı

TARTIşMA

Geleneksel olarak pEg solüsyonları klinik pratikte ozmotik bağırsak preparatları, ilaç

uygulanmasında adjuvan (Valuckaite vd., 2013), konstipasyon sağaltımında (Bekkali vd., 2018) ya da antienfeksiyöz amaçla (Burrows, 2004) (Şekil 3) kullanılmaktadır.



Şekil 3. Polietilen glikolün antibakteriyel özelliği (Burrows, 2004)

Multi-fonksiyonel moleküller olan pEg simultane olarak farklı birçok patolojik oluşumda [doku ödemi, hücre membran disfonksiyonu, immun aktivasyon, ara bağlantı (sıkı kavşak) fonksiyonları ile mukozal bariyerin bütünlüğü] hedef molekül olabilmektedir. Yüksek moleküler hacimleri ve hidrofilik karakterleri nedeniyle, onkotik bir çukur (lavabo) oluşturup su moleküllerini sekestere ederek doku ödemini azaltmaktadır. Reperfüzyon esnasında lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarını azaltmak üzere serbest radikal süpürücü olarak rol teşkil etmektedir. Oksidatif membran hasarından korunma yanında, pEg'ler geçici olarak reverzibl kompleksler (membran lipitleri) oluşturarak hasar gören hücre membranlarına yama yapmaktadır. Böylelikle daha iyi koşullar sağlanana kadar hücre bütünlüğü sağlanmaktadır. Biyolojik yüzeylerde eşsiz davranış modeli sergilemesi en kestirilemeyen özellikleri arasındadır. pEg'ler doğal yüzeylere dayanak teşkil ederek, fiziko-kimyasal özelliklerinde majör değişiklikler sergilemelerini sağlamaktadır. Bu sayede protein ile yüzeysel etkileşim sağlanması; musin yerine geçerek epiteliyal musin tabakasının muhafaza edilmesini ve restorasyonunu sağlamaktadır (Valuckaite vd., 2013).

Önceden elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, pEg 15-20 solüsyonu koruyucu etkinliğine ait aktivasyonu 3 farklı mekanizma; 1) artan onkotik basıncın, ödeme ait sağlığa zararlı etkilerini sınırlama, 2) membran lipitleri

stabilizasyonuna bağlı olarak donör hücrelerinde, dokularında ve organlarında immuno-korunma sağlama (Yandza vd., 2012), 3) muhtemelen en önemli etkinlik olarak doğal müsin gibi davranma (Valuckaite vd., 2013) ile gerçekleştirmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan yüksek hacimli pEg bahis konusu etki mekanizmaları ile sepsis skorlarında azalmaya, yan etkiye mahal vermeksizin sağkalıma neden olmuş olabilir.

Farklı birçok kronik enflamatuvar hastalık durumunda, sağaltımında anti-inflamatuvar ilaçların pEg ile kullanımı söz konusu olabilmektedir. pEg içeren unsurların kendi anti-inflamatuvar etkinliklerinden şekillenebileceği hipotezine dayandırılarak gerçekleştirilen randomize, çift-kör kontrollü bir çalışmada düşük moleküler ağırlıklı ya da yüksek moleküler ağırlıklı pEg solüsyonları lipopolisakkarid ya da zimosanla oluşturulan sistemik enflamasyon sonrası sağkalımı değerlendirmek üzere kullanılmıştır (Ackland vd., 2010). In vivo ve in vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmada düşük moleküler ağırlıklı pEg solüsyonları inflamatuvar sitokin ekspresyonunu, pireksiyi ve mortaliteyi (>%50) her 2 sepsis modelinde de azaltmıştır. Buna karşın yüksek moleküler ağırlıklı pEg solüsyonları sağkalım üzerine her 2 sepsis modelinde daha az etkinlik sağlamış, anti-inflamatuvar etkinlik yeterli olmamıştır. Düşük moleküler ağırlıklı pEg solüsyonları endotoksemik farelerin karaciğerinde lipopolisakkarid kaynaklı pro-apoptotik yolakların aktivasyonunu azaltmıştır. İlgili

çalışmada netice itibarı ile pEg solüsyonları sıkça kullanılabilir, güvenli, non-immunolojik, şimdiye kadar 'henüz yeterince takdir edilmemiş' anti-inflamatuvar bir molekül olarak SIRS ve sepsis sağaltımında rol aldığı tanımlanmıştır (Ackland vd., 2010). Bizim çalışmamızda ne düşük moleküler ağırlıklı [200-400] ne de yüksek moleküler ağırlıklı [>4000] pEg solüsyonları tercih edilmemiş, muhtemel orta dereceli moleküler ağırlıklı lakın yüksek hacimli (3350) (Alverdy & Piano, 1997) olanı tercih edilmiştir. Nitekim çalışmamızda kullanılan pEg solüsyonu her 8 olguda sağaltım öncesi 2-4 arası saptanan SIRS skorlarında 5 günlük uygulama sonrası 0-1 arasına düşürmüştür. Bu yönü ile sınırlı sayıda olguda da olsa, kliniklerde SIRS ve sepsis durumlarında bu çalışmada bir ilk olduğu üzere rektal enema ile pEg kullanımı, tarafımızca tavsiye edilir. Herhangi bir yan etki saptanmaması yine tarafımızca olumlu karşılanmıştır.

Geleneksel olarak antivirulens stratejileri quorum sensing ile etkileşimde bulunan tekil moleküller hedef alınarak geliştirilmiştir. Bu noktada önemli kısıtlardan birisi aday moleküllerin tür spesifik olması gerekliliğidir. Bir başka engel antibiyotiklere benzer şekilde direnç gelişimidir. Kritik hastalıklar esnasında sürekli devinim içerisinde olan bağırsaktaki mikrobiyel ekoloji göz önünde bulundurulursa, herhangi bir spesifik ya da non-spesifik quorum sensing inhibitörü uygulandığında bağırsak mikrobiyomunun nasıl cevap vereceği öngörülemez. Yine kritik hastalıklar esnasında intestinal patojenlerden kaynaklanan letal sepsisi engellemek adına alınacak terapötik önlemler göz önüne alınırsa; mikrobiyota, patobiyota, lokal mikroçevre ve konakçı immun sistemi arasında yer alan çok yönlü moleküler diyalog hatırlanmalıdır. Bu noktada, çalışmamızın da hedefinde olduğu üzere, normal mikrobiyotanın mukavemetinin arttırarak, patobiyota virulensini kontrol altına alabilecek ve kritik kaynakları tutarak direkt

virulensi suprese edecek, böylelikle bu çok yönlü moleküler diyalog içerisinde moleküler huzur sağlayacak fosfatlı pEG unsurlarına ihtiyaç vardır (Zaborin vd., 2014). Anılan koşullar altında fosfatlı pEg uzun ömürlü/dayanıklı ve koruyucu bir şekilde proaktif koşullarda yer alan interaktif patojenik komünitenin provokatif (hastalık) durumlarında ortaya çıkışına karşı öldürücü etki ile fonksiyon göstermesi beklenmektedir. Son sözü edilen çalışmada fosfatlı pEg normal mikrobiyotayı korurken, etkinliğinin patobiyotanın virulensini içermesi, günümüze değin başka herhangi bir anti-infektif ajanda tanımlanmamıştır (Zaborin vd, 2014). Bizim çalışmamızda farklı 8 köpekte SIRS sağaltımına destekleyici olarak kullanılan pEg sağkalıma katkıda bulunmuştur. Özellikle bağırsak kökenli ve farklı ilaçlara dirençli patojenlerin, yüksek derecede virulens göstererek korunma ve sağkalımın güçleştirileceği sepsis durumlarında pEg mühim bir alternatif olabilir (Zaborin vd., 2014).

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik beyan: Hasta sahiplerinden 17.12.2019-18.03.2020- 17.04.2020- 22.05.2020-22.05.2020- 25.05.2020- 17.07.2020 ve 18.08.2020 tarihli "tedavi ve bilgi onam formu" ile izin alınmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Ackland, G. L., Del Arroyo, A. G., Yao, S. T., Stephens, R. C., Dyson, A., Klein, N. J., & Gourine, A. V. (2010). Low-molecular-weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(2), 629-636. Doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c8fcd0.
- Alverdy, J., & Piano, G. (1997). Whole gut washout for severe sepsis: Review of technique and preliminary results. *Surgery*, 121(1), 89-94. Doi: [https://doi.org/10.1016/S00396060\(97\)90187-2](https://doi.org/10.1016/S00396060(97)90187-2).

- Bekkali, N. L., Hoekman, D. R., Liem, O., Bongers, M. E., Van Wijk, M. P., Zegers, B., & Benninga, M. A. (2018).** Polyethylene glycol 3350 with electrolytes versus polyethylene glycol 4000 for constipation: a randomized, controlled trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 66(1), 10. Doi: 10.1097/MPG.0000000000001726.
- Burrows, C. (2004).** Rebuilding the Gut Barrier to Prevent Sepsis. Capsules. The current Literature in brief. *Clinician's Brief*. 1-1. <https://www.cliniciansbrief.com/columns/92/rebuilding-gut-barrier-prevent-sepsis>.
- Hauptman, J. G., Walshaw, R., & Olivier, N. B. (1997).** Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery*, 26(5), 393-397. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1532950X.1997.tb01699.x>.
- Kilpatrick, S., Dreistadt, M., Frowde, P., Powell, R., Milne, E., Smith, S., & Mellanby, R. J. (2016).** Presence of systemic inflammatory response syndrome predicts a poor clinical outcome in dogs with a primary hepatitis. *PLoS One*, 11(1), e0146560. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146560>.
- Valuckaite, V., Seal, J., Zaborina, O., Tretiakova, M., Testa, G., & Alverdy, J. C. (2013).** High molecular weight polyethylene glycol (PEG 15-20) maintains mucosal microbial barrier function during intestinal graft preservation. *Journal of Surgical Research*, 183(2), 869-875. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.035>.
- Wu, L., Zaborina, O., Zaborin, A., Chang, E. B., Musch, M., Holbrook, C., & Alverdy, J. C. (2004).** High-molecular-weight polyethylene glycol prevents lethal sepsis due to intestinal *Pseudomonas aeruginosa*. *Gastroenterology*, 126(2), 488-498. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.011>.
- Yandza, T., Tauc, M., Canioni, D., Rogel-Gaillard, C., Bernard, G., Bernard, A., & Gugenheim, J. (2012).** Effect of polyethylene glycol in pig intestinal allotransplantation without immunosuppression. *Journal of Surgical Research*, 176(2), 621-628. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.10.012>.
- Zaborin, A., Defazio, J. R., Kade, M., Kaiser, B. L. D., Belogortseva, N., Camp, D. G., & Goldfeld, D. (2014).** Phosphate-containing polyethylene glycol polymers prevent lethal sepsis by multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 966-977. Doi: 10.1128/AAC.02183-13.

Western Blot

Western Blot

ÖZET

Western Blot (WB) tekniği, herhangi bir örnekten istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için moleküler biyolojide kullanılan eski ve güvenilir bir yöntemdir. Proteinlerin uyarılara karşı verdiği yanıtların araştırılmasında, protein ifadesinin var-yok ya da artmış-azalmış olarak değerlendirilmesinde, hücre spesifik protein izoformlarının belirlenmesinde, genetik hastalıkların ortaya çıkışından sorumlu proteinlerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir metottur. Yapılan bu derlemede, WB tekniğinin prensibi, protokolü ve virolojide kullanımını hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metot, Viroloji, Western Blot,

ABSTRACT

The Western Blot technique is an old and reliable method used in molecular biology to uniquely detect a single protein from any sample. It is a frequently used method for investigating the responses of proteins to stimuli, evaluating protein expression as either absent or increased-decreased, determining cell specific protein isoforms and determining proteins responsible for the occurrence of genetic diseases. In this composition, information has been provided about principle, protocol and use of Western Blot technique in virology.

Keywords: *Unio terminalis*, nacre, pearl pouch, mantle, graft

GİRİŞ

Blotting (blotlama), bir karışımdaki moleküllerin varlığını ölçmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknik ile çeşitli ayırım ve tespit yöntemleri kombine edilerek, hücrelerin farklı moleküllerinin sentezi belirlenir, antijenleri identifiye edilerek analizi yapılabilir. Çeşitli tipleri olan blotlama; teknik yönden üç kısımda incelenir,

Southern blot

Genomik DNA (gDNA) restriksiyon enzimleriyle kesilerek, fragmentlerine ayrılır. Bu fragmentler büyüklüklerine göre agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayrıldıktan sonra, blot yöntemi ile de filtreye geçirilir. Bölgeye özgü prob (radyoaktif veya diğer tespit edilebilir bir iz ile işaretlenmiş olan; klonlanmış bir DNA veya RNA molekülüdür. Bu moleküller hibridizasyon ile onun komplementer (eş) dizisinin bulunmasında kullanılır), yalnızca kendisine tümleyici bazıları içeren DNA fragmentleriyle hibridize olur ve bu da filtre üzerine uygulanan otoradyografi işlemiyle bantlar üzerinde görünür hale getirilir (Schlickeiser & Pleyer, 2007).

How to cite this article

Ashm, HP., Bulut O. (2021). Western Blot. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 45-56. <https://doi.org/10.31797/vetbio.799660>

Review Article

Hatice Pelin ASLIM^{1a}

Oya BULUT^{1b}

¹Department of Virology,
Faculty of Veterinary
Medicine, Selcuk University,
Konya, Turkey

ORCID-

^a[0000-0001-9160-1255](https://orcid.org/0000-0001-9160-1255)

^b[0000-0002-2407-7390](https://orcid.org/0000-0002-2407-7390)

Correspondence

Hatice Pelin ASLIM

hpelinucan@gmail.com

Article info

Submission: 24-09-2020

Accepted: 02-01-2021

Online First: 19-02-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0

International License



Nothern blot

m(RNA) ya da virus RNA'sının saptanması amacıyla kullanılır. Test; RNA-DNA ya da RNA-RNA hibridizasyonu oluşturarak yine filtre üzerine otoradyografi yapılarak gerçekleştirilir (Schlickeiser & Pleyer, 2007).

Western blot

WB hücre ve moleküler biyolojide kullanılan çok önemli bir tekniktir. WB tekniği hücrelerden ekstrakte edilmiş proteinlerin kompleks karışımından spesifik proteinlerin identifiye edilmesinde kullanılan bir teknik olup üç temel adımdan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, (1) farklı boyutlara sahip olma prensibine dayanılarak yapılan ayırım, (2) katı bir faza (membrana) aktarım, (3) görünür hale getirmek için uygun birincil ve ikincil antikorları kullanarak hedef proteini işaretlemedir (Şekil 1) (Memelink vd., 1994).

Immüno blotlama olarak da adlandırılan WB tekniği, belirli bir protein veya protein profilini analiz etmeye yarayan yüksek hassasiyetli ve yarı kantitatif (semi-quantitative) moleküler bir tekniktir (Kurien & Scofield, 2006).

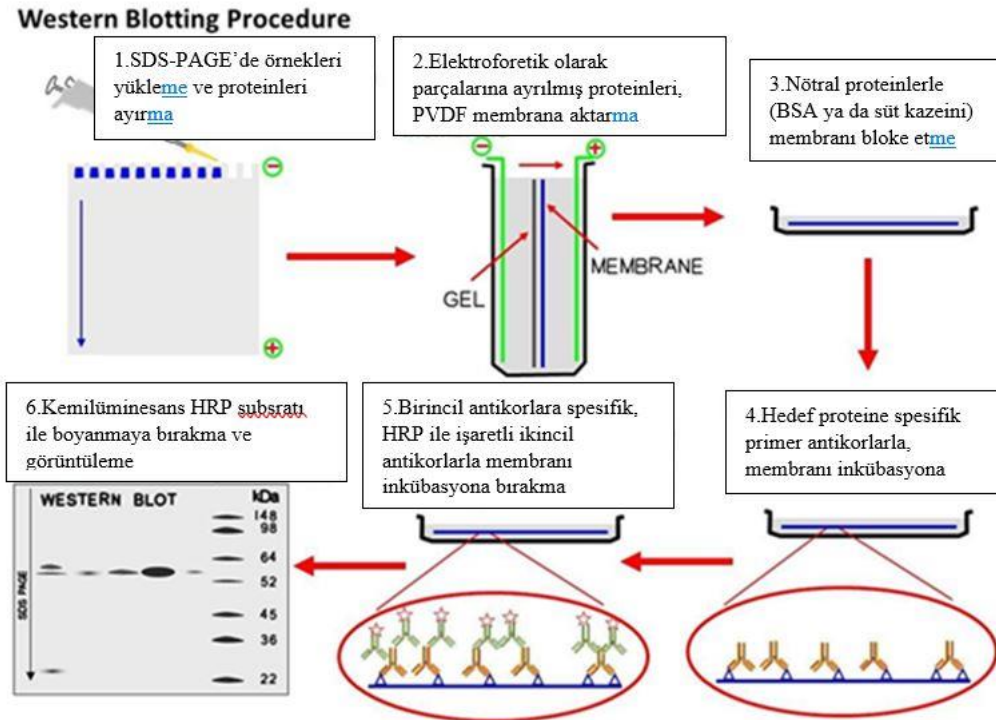
WB tekniği, ilk kez 1970 yılında Ulrich Laemmli tarafından poliakramid jelde

elektriksel güç vasıtasıyla molekül ayırım prensibi kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yüzyılın sonunda, Towbin (1979) proteinlerin poliakramid-üre jelden nitroselüloz membranlara transferi tanımlamıştır. İki yıl sonra Burnette, poliakramid jel ve sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) kullanılan WB tekniğini bildirmişlerdir. Günümüzde WB, enfeksiyöz, otoimmün, romatizmal ve onkolojik hastalıkların teşhisi için biyomedikal alanda anahtar bir teknik haline gelmiştir (Martínez-Flores vd., 2017).

TEKNİK

Protein ekstraksiyonu ve hücre lizisi

WB, hayvansal ve bitkisel dokulardan, hücre kültürlerinden, bakterilerden ve mayalardan proteinleri belirleyebilen çok yönlü bir tekniktir. Sonuçları düzgün bir şekilde elde etmek için, mekanik ve kimyasal metotlarla yapılabilen iyi bir protein ekstraksiyonu gereklidir. Aşındırıcı kullanarak yapılan sonikasyon, cam veya metal boncuklarla yapılan homojenizasyon gibi yöntemler en çok kullanılan mekanik metotlardır (Martínez-Maqueda vd., 2013).



Şekil 1. Western Blot prosedürü (CUSABIO 2018)

Kimyasal metotlar; proteinleri çözdürme yeteneğine sahip tamponların kullanımını içerir. Bu tamponlarda sodyum dodesil sülfat (SDS), deoksikolat ve setil trimetilamonyum bromür (CTAB) gibi iyonik deterjanlar mevcuttur. Ayrıca iyonik olmayan veya zwitteriyonik kimyasallar gibi başka deterjanları kullanmak da mümkündür ve seçim, istenen ekstraksiyon verimliliği ile litik etkinin hızına bağlıdır. Örneğin; SDS saniyeler içinde hücreyi lize edebilir ancak proteinleri de denatüre edebilir. Triton X-100, protein denatürasyonu veya protein kompleksinin parçalanmasından sakınarak; hücreleri düzgünce ve yavaşça lize edebilen iyonik olmayan bir deterjandır. Bu metot, protein yapısı veya protein aktivitesini içeren testler için tavsiye edilir. [(3-kolamidopropil) dimetilamonyum], -1-propansülfonat gibi zwitteriyonik deterjanlar çözünmüş proteinin yükü ya da net yük etkilenmeden kullanılabilir. Proteinleri çözdürmedeki verimliliği açısından en çok kullanılan tamponlardan biri, proteazın ticari bir inhibitörü, pH 7.5 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0,5 sodyum deoksilat, %0,1 SDS ve 5 mM EDTA içeren radyoimmünopresipitasyon testi tamponu (RIPA)'dur. Kolon kanseri hücre hattı HT-29'da bu içerikler sitoplazmik proteinleri çözerek yüksek verimlilik gösterir (Flores ve ark 2017). RIPA'ya ilaveten, Tris-Triton (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton X-100, %10 gliserol, %0,1 SDS, %0,5 deoksilat) ve 20 mM Tris-HCl pH 7.5 gibi sitoplazmik proteinlerin ekstraksiyonu için tamponlarda vardır. Lizis tampon solüsyonlarına ilave edilen proteaz inhibitörlerinin kullanım amacı protein yapılarının korunmasıdır. Sonuç olarak, lizis işleminden sonra alt-hüresel fraksiyonlar diferensiyel santrifüjlerle ayrılır; tortuda membran proteinlerini, süpernatantta çözünen proteinleri elde etmek mümkündür (MacPhee vd., 2010; Jensen, 2012).

Protein miktarı

Elektroforez işleminden önce; protein konsantrasyonlarını belirlemek ve jelin kuyularında bulunan miktarı homojenize etmek için, protein içeriği miktarının belirlenmesi gereklidir. Çok fazla proteinin olması testin yanlış sonuç vermesine sebep olur. Proteinlerin

nicelleştirilmesi için farklı metotlar vardır. En çok kullanılanlar Lowry, Bradford ve bisinkoninik asit (BCA)'tir. Bu kalorimetrik testler, bazı protein aminoasitlerinin farklı reaktiflerle reaksiyona girdiği zaman, şekillenen renk değişimine dayanır (Sapan vd., 1999).

Lowry protein testi

Bu metot Follin reaktif ve bakırın kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. 750 nm dalga boyunda tespit edilir ve renk yoğunluğu protein konsantrasyonunu verir (Martínez-Flores vd., 2017).

Bradford protein testi

Bu yöntemde; proteinlere bağlanabilen ve 465-595 nm dalga boyunda belirlenebilen renk değişimine sebep olan "Coomasie Brilliant Blue" boyası kullanılır (Martínez-Flores vd., 2017).

Bisinkoninik testi

Bisinkoninik asit (BSA) ile protein testi oldukça yüksek duyarlılığa sahiptir. BSA olarak bilinen; yüksek duyarlılıkla Cu^{2+} iyonlarını tespit edebilen bir reaktifin varlığında, Cu^{2+} iyonlarıyla proteinlerin reaksiyonunu içerir. Proteinlerin makromoleküler yapıları ve dört spesifik peptidleri (sistin, sistein, triptofan ve tirozin); 562 nm dalga boyunda belirlenebilen örneklerin rengindeki, mora dönüşten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Martínez-Flores vd., 2017).

1. Soğuk PBS eklenerek hücre kültürü şişesinde hücreler yıkanır ve nazikçe sallanır. PBS uzaklaştırılır (öneri: doku kültürü tabağı buzun üstünde tutulmalıdır).

2. Tekrar PBS eklenir ve hücreleri yüzeyden kaldırmak için bir hücre sıyrıcı kullanılmalıdır. Karışım mikrosantrifüj tüplerinde pipetlenir.

3. 1500 rpm'de santrifüj işlemi uygulanır ve süpernatant uzaklaştırılır.

4. 20 µL taze proteaz inhibitör karışımı ile 180 µL soğuk hücre lizis tamponu (Tris-HCl çözeltisi, üre, SDS, gliserol, β-merkaptotanol, bromfenol mavisi) eklenir. Öneri: eğer protein konsantrasyonu yeterince yüksek değilse, proteaz inhibitör karışımının daha yüksek konsantrasyonda eklenmesi ve prosedürün tekrarlanması tavsiye edilir).

5. Buzda 30 dk inkübasyona bırakılır ve sonra +4°C'de 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak lizat (hücre duvarı veya hücre zarının parçalanması ile açığa çıkan hücre içeriği) elde edilir.

6. Yeni bir tüpe süpernatant (ya da protein karışımı) aktarılarak -20°C ya da -80°C'de dondurularak ya da buz içerisinde muhafaza edilir.

7. Spektrofotometrik olarak protein konsantrasyonları ölçülür.

Örnek Hazırlama

1. Konsantrasyon = kütle/hacim

Her gözde 50 µg olacak şekilde protein ekstralarının hacmi belirlenir.

2. Numuneye 5 µL numune tamponu eklenir ve iki kez damıtılmış distile su kullanılarak, her şeritteki hacim eşit hale getirilerek iyice karıştırılır (öneri: şerit başına toplam 15 µL tavsiye edilir).

3. Numuneler 100°C'de 5 dk ısıtılır. Böylelikle proteinler primer yapısına dönüşür (Mahmood & Yang, 2012).

Jel elektroforez

Proteinleri ayırmak için kullanılan birkaç metot vardır, bunların çoğu; çözünürlüğü geliştiren bir nişasta jeli olan selüloz asetat kâğıdı içerir. Fakat bunların gözenek boyutu üzerinde kontrol sağlayamadığı belirlenmiştir. Son zamanlarda poliakramid jeller, akrilamid (%T olarak anılır) ve bisakrilamid (%C olarak anılır) yüzdesinin düzenlemesi sayesinde gözenek büyüklüğünü kontrol etmek için kullanılmaktadır. Akrilamidin daha yüksek bir yüzdesiyle (%10-20 T) gözenek büyüklüğü azaltılır ve jel düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (50 kDa'den küçük), ayrılması için ideal hale getirilir. Akrilamidin daha düşük yüzdesine sahip jeller (<%10 T) daha yüksek molekül ağırlığına sahip (100 kDa'den daha büyük) proteinleri ayırmak için tavsiye edilmektedir. Amonyum persülfat ve tetrametilendiamin (TEMED) ilavesi, akrilamid polimerizasyonunu hızlandıran serbest radikaller oluşturur. Poliakramid jeller için olan tamponların çok çeşitli oluşu, proteinleri ayırmak ve tanımlamak için hızlı bir metot sağlar (Martínez-Flores vd., 2017).

Jel tipleri

Poliakramid jeller sayesinde proteinlerin ayrılması denatüre edici koşullar altında gösterilebilir. Denatüre etmeyen poliakramid jeller (ND-PAGE) protein yapısını üç boyutlu şekilde korur ve ayrılma elektriksel yük, boyut ve şekle dayalı olarak şekillenir. Protein yapısını korumak için; indirgeyici ve denatüre olmayan, pH aralığı 8.3-9.5 olan tri-glisin ya da 7.0-8.5 pH'da tris-borat ve 7.2-8.5 pH'da tris-asetat gibi tampon solüsyon kullanılır. Aksine, denatüre eden poliakramid jellerde (SDS-PAGE) protein yapıları, bir anyonik deterjanın (SDS), bir indirgeyici ajanın (beta-merkaptotanol) ve ısının kombinasyonunu kullanarak peptidlere ayrılmıştır. Beta-merkaptotanol ve ısı, disülfid köprülerini (Cys-S-S-Cys) kırar ve polipeptid zincirlerinde olan tiol gruplarına (Cys-SH) ayrıştırır, SDS ise proteinlere negatif yük sağlar ve bağlar (Martínez-Flores vd., 2017).

Jel kalıbının oluşturulması

İki cam, aralarına iki çubuk (Spacer) yerleştirdikten sonra arka arkaya konarak düzeneğe yerleştirilir. Altan sızıntı olmaması için aşağı doğru bastırılır.

Ayrıştırıcı jel (seperating gel) karışımı hazırlandıktan sonra, pipetle hızlıca ve dikkatli bir şekilde kenarından kalıpların arasına dökülür, bu esnada kabarcık oluşmamasına dikkat edilir. Bu işlem çok hızlı yapılmalıdır çünkü, katalizörler eklendikten sonra jel solüsyonu 5-10 dakika içerisinde tamamen donmaktadır. Üst kısmın düzgün bir yüzey oluşturması ve hava almaması için 0,5 cc kadar "Bütanol veya İzopropopranol (alkol)" yavaşça eklenir. Jel iyice polimerleştikten sonra konan alkol geri boşaltılır ve üzerine istifleme jeli (stacking gel) hazırlanarak aynı şekilde dökülür. Döker dökmez, son olarak "tarak (comb)" yerleştirilerek jel polimerleşmeye bırakılır, böylece "kuyular (well)" oluşturulmuş olur (Kurien & Scofield, 2009).

SDS-PAGE

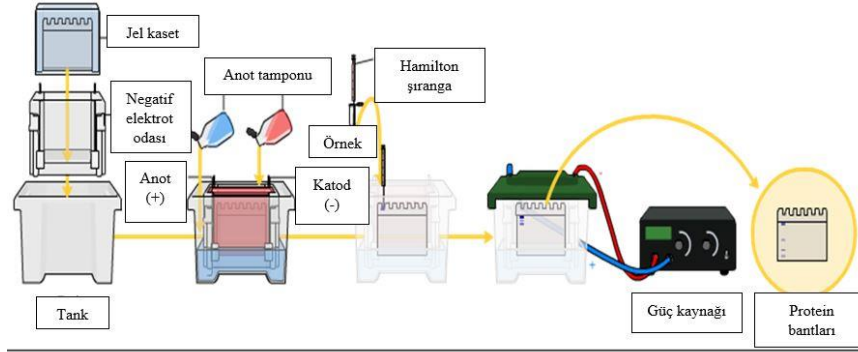
SDS

Oligomerik proteinleri alt birimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan polipeptidlere

bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu oluşan kompleks polipeptidlerin negatif yüklü kalmasını sağlar (Anonim, 2020a).

PAGE

Elektriksel çekim kuvveti kullanılarak proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan ortama denir (Schägger, 2006).



Şekil 2. SDS-PAGE şeması (Anonim, 2009) SDS-PAGE

Proteinlerin jel üzerinde görünür hale getirilmesi-Jelin boyanması

- 1- Jel sistem üzerinden çıkartılır.
- 2- Jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerine sabitlenmelidir (fiksasyon).
- 3- Fiksatiften geçirilen jel hafif distile su ile yıkandıktan sonra boyama işlemine alınır (%40 metanol, %10 asetik asit içeren bir çözelti).
- 4- Coomassie brilliant blue (CBB) ile boyama (etanol, asetik asit ve Coomassie parlak mavisi) yapılarak işlem tamamlanır (Mahmood ve Yang, 2012).

Devamlı ve devamsız tampon sistemleri

Tampon türlerinin bağlı olduğu iki elektroforez sistemi vardır. Birincisi Weber ve Osborn'un sürekli tampon sistemleri; ki bunlarda, aynı çalışan tampon, tek ayrıştırıcı jel ve tankta kullanılır İkincisi Laemmli'nin sistemidir ve iki tip jel kullanılır. Bunlar; %4'lik akrilamid ile yapılan büyük gözenekli istifleme jeli (stacking gel) ve istifleme jelinde polimerizasyon yapan küçük gözenekli çözücü jel (resolving gel)'dir. Süreksiz sistemde, her jelde kullanılan tamponlar farklıdır ve bunlar pH ve iyonik güce göre değişir (Martínez-Flores vd., 2017).

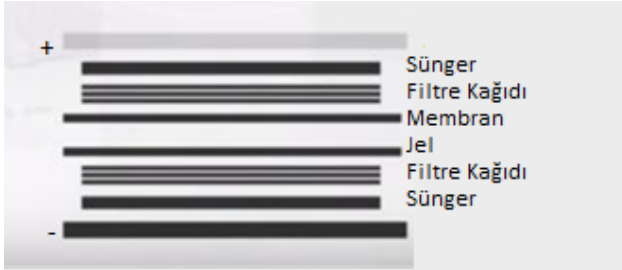
Elektrotransfer (proteinlerin membrana aktarılması)

Bu teknikte, proteinler; membran gibi dirençli katı bir desteğe aktarılmalıdır. Böylece proteinler kolaylıkla spesifik antikorla

immünodetection sürecinde ele alınabilir ve kullanılabilir. Membran jel ile pozitif elektrot arasına yerleştirilir ve proteinler, jeldeki yerlerine göre membrana tutunur. Transfer, yarı-kuru veya ıslak sistemlerden biri vasıtasıyla gösterilebilir (Şekil 2). Transferin her iki tipinde de farklı tamponların kullanımı tavsiye edilir, örneğin; Tris-glisin'in; %20 methanolla veya methanolsüz, 8.3-9.2 pH'da ve %0,025-0,1'lik konsantrasyonda SDS'le, 9.9 pH'da bikarbonat tamponuyla ya da 1x TBE (Tris-borat 90 mM, EDTA 1 mM) ile %0,025-0,1'lik SDS ile kullanımı gibi farklı konsantrasyonları mevcuttur. %20 methanolla, %0,1 SDS içeren 8.3 pH'daki Tris-glisin tamponu en çok kullanılan tampondur. Metanolsüz tampon SDS-PAGE jel için evrenseldir. Methanol iki ana göreve sahiptir. Bunlar; SDS'nin proteine ayrışmasını tetiklemesi ve SDS'nin varlığında membranlarda proteinlerin adsorpsiyonunu önemli derecede geliştirmesidir. Fakat bu etkiler proteinler arasında değişkenlik gösterebilir. Transferde sıklıkla kullanılan destekler; sonucu etkileyebilecek özelliklere sahip nitroselüloz ya da poliviniliden diflorid (PVDF) gibi mikro gözenekli yüzeylerdir. Nitroselülozun aksine PVDF membranı daha güçlüdür ve proteinlere daha iyi bağlama sağlar. Yinede, nitroselüloz membranda daha az non-spesifik bağlanmalar gözlenir. Nitroselüloz membranla karşılaştırıldığında, PVDF membranlar yüksek hidrofobik yapıya sahip oldukları için işlem öncesi metanol ya da etanol

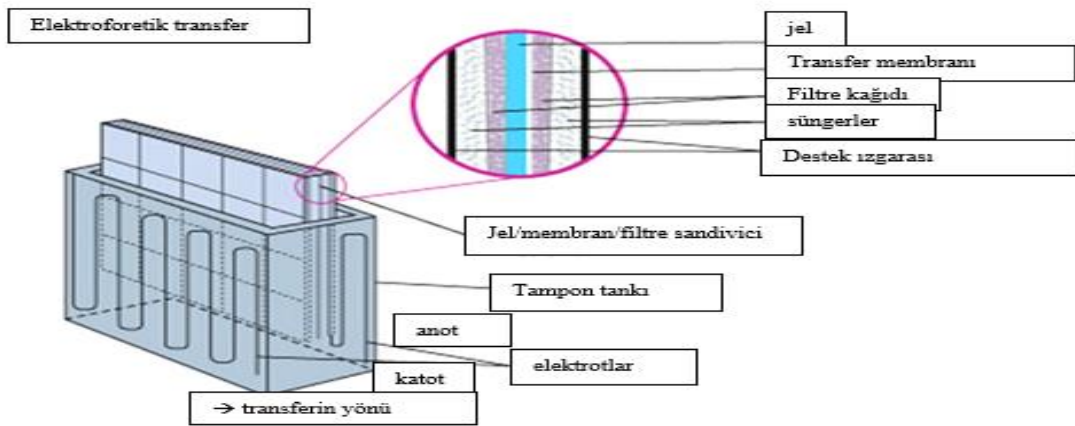
ile nemlendirilmelidir ve onların herhangi bir sürfaktanı yoktur. Son zamanlarda, non-spesifik bağlanmaları azaltmak için düşük otofloresans membranlar kullanılmaktadır (Martínez-Flores vd., 2017).

Elektroforez gerçekleştirilmeden önce, örnekler yükleme tamponu (loading buffer) olarak bilinen (bu tampon herhangi bir sızıntıdan kaçınmak ve kuyucuklara örnekleri yüklemeye olanak sağlamak için örnekleri ağırlık, yoğunluk ve renk sağlamayı amaçlar) bir tamponda 70-95 °C arası bir sıcaklıkta ısıtılır. Bu tampon 6.8 pH'da 62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% gliserol, 100 mM dithiothreitol (DTT) ve %0.01 bromofenol mavisi içerir. Bu içerikler arasında, DTT ve betamerkaptoetanol disülfid bağlarını kıran, indirgeyici ajanlardır. Öte yandan, SDS; primer yapıya sahip proteinlerin denatürasyonunu sağlar ve onları negatif yükle kaplar, böylece proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrılması mümkün hale gelir. Buna ek olarak, indirgeme ve denatürasyon, antikorun birleşme bölgesine ulaşmasına izin verir. Jelde, düşük molekül ağırlığı (MW)'na sahip proteinler, dibeye göç eder ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip olanlar yukarıda kalır (Martínez-Flores vd., 2017).



Şekil 3. Elektroforetik Transfer Sandivici

WB “stacking (istifleme)” ve “seperating (ayırıştırıcı)” denilen iki farklı agoroz jel tipi kullanılır. Üst kısımda bulunan istifleme jeli biraz asidiktir (pH 6.8) ve proteinin zayıf şekilde ayrıldığı ince, ancak keskin bantların oluşmasına olanak sağlayan gözenekli bu jel düşük akrilamid konsantrasyonuna sahiptir. Ayırıştırıcı ya da “resolving” denilen alt kısımda yer alan jel ise esastır (pH 8.8) ve jelin gözeneklerini daraltıran poliakramidin daha yüksek konsantrasyonuna sahiptir. Daha küçük proteinler, daha büyük proteinlerden daha kolay ve hızlı bir şekilde taşındığı için, protein bu jelde boyutları vasıtasıyla daha çok ayrılır. Jel üzerine yüklendiğinde proteinler negatif yüke sahiptir çünkü ısıtılarak denatüre edilirler ve voltaj uygulandığı zaman pozitif elektrota doğru hareket edeceklerdir. Bu teknikte jel, protokol bölümünde açıklanan solüsyonlar kullanılarak iki cam ya da plastik plaka arasına dökülerek hazırlanır. Numuneler ve bir marker her bir kuyucuğa yüklenir ve boş kuyucuklar numune tamponuyla yüklenir. Daha sonra jel tankı güç kaynağına bağlanır ve çalıştırılır. Protein karışımının ayrılmasından sonra membrana transfer edilir. Transfer jelin yüzeyine dik bir elektrik alan kullanılarak yapılır; bu da proteinlerin jelin dışına çıkmasına ve membranın üzerine geçmesine neden olur. Transferin bu tipine “elektroforetik transfer” denir. Bunun için Sünger-Filtre kâğıdı-Jel-Membran-Filtre kâğıdı-Sünger sandviçi oluşturulur ve transfer aparatına yerleştirilir (Şekil 3, 4) (Mahmood & Yang, 2012).

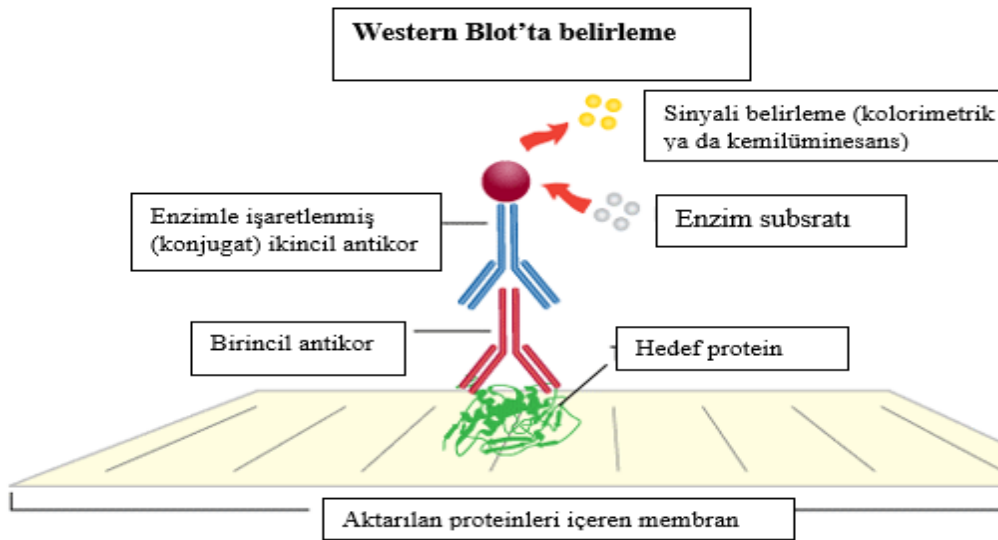


Şekil 4. Elektroforetik Transfer

Blokaj ve antikor inkübasyonu

Blokaj, membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır. Blokaj, dilue protein çözeltisi içinde (BSA-Bovin Serum Albumin veya Yağsız Süt tozu-TBST karışımı) oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda bekletilerek gerçekleştirilir. Yağsız Süt tozu-TBST solüsyonundaki proteinler membran üzerinde, hedef proteinin bulunmadığı tüm bölgeyi kaplar. Böylece kullanacağımız primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanmaları sağlanır. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, konjuge enzim ya da boya içeren

sekonder antikor ile inkübasyona bırakılır. Primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşur (Mahmood & Yang, 2012). Primer antikorun elde edileceği tür, örnek türden farklı olmalıdır. Bu, sekonder anti-immünoglobulin antikorunun numunedeki endojen immünoglobulinlerle çapraz reaktivasyonunu önlemek içindir. Örneğin, bir fare proteini üzerinde çalışılacaksa, fare dışındaki bir türden elde edilmiş bir birincil antikor seçilmelidir. Tavşanda oluşturulan primer antikor ve anti-tavşan sekonder antikoruna uygun bir seçim olacaktır. İkincil antikorlar, kullandığımız birincil antikorun konakçı türlerine karşı olmalıdır (Anonim, 2020b).



Şekil 5. Western Blot'ta hedef proteinin belirlenmesi

Proteinlerin immünodetectionu

Kemilüminesans immünodetection

Kemilüminesans tarafından yapılan immünodetection, ışıldayan bir bileşikle (luminol) reaksiyonu sonucunda ışık biçiminde enerji yayabilen, peroksidaz ya da fosfotaz enzimleri kullanır. Bu şekilde antijen-antikor bağlanmasının belirlenmesine olanak sağlanmış olur. Işık reaksiyonu otoradyografik filmde geliştirilir ve son zamanlarda protein ilgisini belirlemek için dijital kamera ile dijital olarak yakalamak için kullanılmaktadır (Şekil 5) (Martínez-Flores vd., 2017).

Floresans ile immünoalgılama

Bu metotta ikincil antikorlar bir floresan marker veya floroforla birleşir ve doğrusal bir algılama sinyali oluştururlar, uyarıldıklarında ışık

yayarlar. Farklı dalga boylarının filtrelerine sahip bir dijital kamera, yayılan ışığı belirler. Kemilüminesans tarafından ortaya çıkan görüntülere benzerdir ve ortaya çıkan görüntüler aynı prensiple analiz edilir. Fakat kemilüminesans immüno algılama metodunun aksine, sonuç sinyalinin stabilitesinden dolayı niceldir (Martínez-Flores vd., 2017).

VİROLOJİK ÇALIŞMALARDA WESTERN BLOT'IN KULLANIMI

Antiserumların antijen spesifikliğinin belirlenmesine izin verebilecek bir tekniğe duyulan ihtiyaç, 1970'lerin sonuna doğru WB tekniğinin keşfine yol açmıştır (MacPhee, 2010). Bu metotla etkene ait proteinlerin bir membrana bağlanmadan önce bir jel üzerinde ayrıldığı için spesifik proteinlere karşı antikor

yanıtı değerlendirilebilmektedir. Böylelikle, diğer testlerin sonuçlarını doğrulamayı sağlar. WB, bireysel patojen proteinlerine karşı antikor tespit ettiğinden, diğer analizlerden daha spesifiktir. Böylelikle antikorun spesifik olmayan proteinlerle, yanlış pozitif sonuçlar vermesinde kaçınılır (Kennedy vd., 2005). WB, virusa spesifik antikor yanıtını tespit etmek için yapılan *lentivirus*, *herpesvirus*, *coronavirus poxvirus* ve *adenovirus* gibi birçok farklı virus familyasıyla yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Whetstone vd., 1991; Martins vd., 2001; Woo vd., 2004; Goldberg vd., 2008; Li vd., 2011).

Streckert vd. (1986) yaptıkları bir çalışmada; tavşanların SV40 virusunun VP2 ve VP3 proteinlerinin karboksi-terminal bölgesine tekabül eden Arg-Asn-Arg-Ser-Ser-Arg-Ser dizisinin sentetik bir heptapeptid aşısı ile aşıladıklarını bildirmişlerdir. Sentezlenen antikorlar, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ve WB analizinde viral proteinleri tanımıştır. Antipeptid antikorlarının spesifitesinin normal antikorlardan yüksek olduğu protein elektroblot analizi ve karşılaştırma testleri ile ortaya koymuşlardır. Antikorların immünofloresans testi ile enfekte hücrelerdeki VP2 ve VP3'ü tanıdığını fakat virionlar ile hiçbir etkileşim gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Schaller vd. (1999) yaptıkları bir çalışmada; sığır ve koyun hastalıklarına özgü, proteaza dirençli prion proteini (PrPSc) tespit etmek için Prionics Western Blotting (PWB) prosedürünün hassasiyetini, özgüllüğünü ve güvenilirliğini test eden birkaç bağımsız çalışmanın sonuçlarını bildirmişlerdir. PWB tekniği ile BSE ile enfekte sığırların, klinik olarak normal hayvanlardan ya da BSE ile ilişkili olmayan nörolojik hastalıklı sığırlardan ayrımı ile ortaya konulmuştur. Genel olarak, bu tekniğin çok yüksek duyarlılığa, özgüllüğe ve güvenilirliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Doğru bir teşhis için, hayvanların beyin bölgesinin doğru örneklenmesinin ve protein ekstraksiyonu için kullanılan yöntemin ne kadar önemli bir faktör olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlarla, hızlı bir teşhis aracı olarak subklinik hayvanları tanımlanmada PWB prosedürünün güvenilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sosnovtsev ve Green, (2000) yaptıkları çalışmada; Kedi calicivirus (FCV) virionlarında molekül kütlesi 8.5 ve 15.5 kDa olan iki küçük protein tespit etmişlerdir. Sekans analizi sonucunda 8.5 kDa proteininin N-terminal dizisinin, FCV genomunun open reading frame 3'ü (ORF3) tarafından kodlandığını göstermişlerdir. 15.5 kDa proteininin N-terminal dizisinin ise FCV ORF1 poliproteininin 961-980 amino asitlerine karşılık geldiğini ve calicivirus VPg (viral protein genome-linked)'nin genomik konumuna eşlendiğini belirtmişlerdir. WB analizlerinde, VPg'nin N-terminal ucundaki 20 aminoasite veya ORF3'e karşı oluşan antikorların, saflaştırılmış FCV virionlarında ve FCV ile enfekte hücrelerde mevcut olan proteinlerle reaksiyona girdiğini belirlemişlerdir. Virion proteinlerine dahil edilen radyoaktivitenin karşılaştırmalı bir analizinin, ORF3 proteininin muhtemelen virion başına bir ya da iki kopyasının olduğunu belirtmişlerdir. Virionlarda bulunan ORF3 proteinin hareketliliğinin, FCV ile enfekte olmuş hücrelerde bulunan veya bakteriler kullanılarak eksprese edilen ORF3 proteininin hareketliliğine benzediği ifade edilmiştir. Bakteriyel ekspresyon sisteminde eksprese edilerek elde edilen saflaştırılmış ORF3 proteininin direkt N- ve C- terminal sekans analizi; bozulmamış, açılmamış terminallerin varlığını göstermiştir ve buda; SDS-PAGE'de hesaplanan ve görüntülenen kütleler arasındaki farkın, proteinin proteolitik işlenmesinden kaynaklanmadığını akla getirdiğini ifade etmişlerdir.

Minafra vd. (2000) yaptıkları bir çalışmada; Kaliforniya Grapevine rupestris stem-pitting-associated virus (GRSPaV) izolatının tüm genom sekans analizine dayalı olarak, uygun primerlerle GRSPaV'nin "*coat protein*" genini amplifiye etmişlerdir. Tavşanlardan antiserum elde etmek için *Escherichia coli*'de eksprese edilen rekombinant GRSPaV *coat protein*'ini antijen kaynağı olarak kullanmışlardır. Dot immunobinding veya WB yöntemiyle enfekte asma yaprak ekstratlarında tespit edilen virus çeket proteinini ile başarılı bir şekilde antiserum elde edilmiştir. Antiserum titresini WB'la 1:5.000 olarak tespit etmişlerdir.

Liu vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada; klonlanmış circovirus DNA'sı ile bir domuz retina hücre hattının (VIDO R1) transfeksiyonundan sonra, enfeksiyöz domuz circovirus tip 2 (PCV2)'yi üretmişlerdir. Enfeksiyondan sonraki 24 saatte open reading frame 2 (ORF2) geni, ORF2 spesifik poliklonal antikor kullanarak WB ile belirlenmiş ve enfeksiyon boyunca giderek artmıştır. Dahası, ORF2 proteini saflaştırılmış PCV2 virusunda da tespit edilmiştir; bu, ORF2'nin PCV2 viral kapsidinin yapısal bir bileşeni olduğunu kanıtlar şeklinde ifade etmişlerdir.

He vd. (2004) çalışmalarında; şiddetli akut solunum sendromu (SARS) coronavirus enfeksiyonu için hızlı bir serolojik tanı kiti geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla kullanılacak antijenik bir determinanı tanımlamak ve insanlarda SARS coronavirus enfeksiyonu sırasında oluşan immun yanıtı incelemek için, nükleokapsid geninin tam uzunluğunu ve kesilmiş altı parçasını klonlayarak eksprese ettiklerini belirtmişlerdir. Daha sonra bölgeleri glutatyon S-transferaz etiketli rekombinant proteinler olarak saflaştırmışlardır. 33 SARS coronavirus pozitif serum, 66 negatif serum ve diğer hayvan coronaviruslarına karşı oluşan antikorları içeren bir antikor paneline karşı bu rekombinant proteinlerin reaktivasyonunu incelemişlerdir. SARS coronavirusuna karşı antikorları tespit edebilen güçlü bir nükleokapsid proteininin (N195) C-terminalinden ayrılmış bir amino asit parçası belirlediklerini bildirmişlerdir. N195 proteini ve tavuk, domuz ve köpek coronaviruslarına karşı oluşan antikorlar arasında, çapraz reaksiyon bulunmadığını ifade etmişlerdir. SARS coronavirusuna karşı oluşan antikorları tespit etmek için N195 proteini kullanarak geliştirdikleri bu WB tekniği ile 274 numune inceleyen araştırmacılar, bu testin spesifitesini ve sensitivitesini sırasıyla %98,3 ve %90,9 olarak ifade etmişlerdir. Sonuç olarak N195 proteininin, WB'ta antijen olarak uygun bir protein olduğu ve SARS coronavirus enfeksiyonunun saptanması için diğer muhtemel testlerde de kullanılabileceği belirtilmiştir.

Thiry vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada; Hepatitis E Virus (HEV)'unun serolojik analizi için 383 yaban domuzu, 189 alageyik ve 235

karaca serumu toplamışlardır. Alageyik'te %1 ve karacada %3 ve yaban domuzunda %34'lük bir seroprevalans bulmuşlardır. ELISA tarama prevalansını değerlendirmek için, WB analizleri yapılmış ve WB'a göre değişen ELISA spesifiteleri analiz etmişlerdir. Alıcı çalışma karakteristiği Receiver Operating Characteristic (ROC), eğrisine sahip olan ve referans test olarak kabul edilen WB testini, ELISA'nın CO noktasını (optimum kesimi) araştırmak için kullanmışlardır. Değişen ELISA spesifiteleri, WB'ye göre, yaban domuzunda HEV seroprevalansını analiz etmek için kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, yaban domuzunda, 69 serumdan 4'ü HEV RNA'sı için pozitif olarak tespit edilmiş ve bu sebeple yaban domuzunun, virusun konakçı rezervuarı olarak düşünülebileceğini ifade etmişlerdir.

Hassan vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada; Sığır adenovirusu tip 3 (BAdV-3) E1 bölgesinin dizi analizi, diğer AdV'lerde gözlenmeyen yeni bir 155R ORF varlığını ortaya koymuşlardır. BAdV-3 ile enfekte olmuş hücrelerdeki 155R gen ürünleri; sekanslama ve 155R spesifik antikor kullanarak yapılan WB analizleri ardından Northern blot ve reverse transkriptaz PCR ile identifiye edilmiştir. 155R'nin, geç bir protein gibi görüldüğünü ve saflaştırılmış BAdV-3 partiküllerinde mevcut olduğunu bildirmişlerdir. 155R ORF'da bir (BAdV / 155R / mt1) ya da iki (BAdV / 155R / mt2) stop kodonuna sahip BAdV mutantlarının çoğalma kinetiği, BAdV-3'ünkiyle karşılaştırıldığında 155R'nin hücre kültüründe virüs replikasyonu için gerekli olmadığını belirtmişlerdir.

Siedler vd. (2017) çalışmasında, BoHV-1 ve BoHV-5'de yüksek oranda korunmuş bölgeler içeren gE'nin, bir kodon optimize sentetik dizisini, *Pichia pastoris*'te eksprese etmişlerdir. Ekspresyondan sonra, rekombinant gE (rgE) salgılanmıştır ve kültür ortamından saflaştırmışlardır. rgE'yi, BoHV-1 ve/veya BoHV-5 ile doğal olarak enfekte olan sığırlardan ya da deneysel olarak vahşi tip BoHV-5 ile enfekte edilmiş sığırlardan alınan serumları kullanarak WB ile araştırmışlardır. BoHV-5 gI/ gE/US9 marker aşısı ile aşılanmış sığırdan toplanan serumun, rgE'yi tanımadığını bildirmişlerdir. *P.pastoris*'te, rgE'nin ekspresyonu ile çok miktarda rgE üretimine olanak sağlandığı da bildirmişlerdir.

Böylelikle aşılınmış ya da doğal olarak enfekte olmuş sığırların birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılacak olan immünotestlerde, rGE'nin ekspresyonunun kullanılmasının uygun olduğunu ifade etmişlerdir.

Hemmatzadeh ve Kazemimanesh, (2017) yaptıkları bir çalışmada, dokuz adet Newcastle disease virus (NDV) ile enfekte numuneyi. embriyolu tavuk yumurtalarında çoğalttıktan sonra konsantre etmişler ve ultra- santrifüj işlemi ile saflaştırmışlardır. Daha sonra numuneleri, spesifik antikoları kullanarak %12,5 SDS-PAGE ve Western blotlama işlemine tabi tutmuşlardır. SDS-PAGE'de tüm velojenik ve aşı suşları aynı elektroforetik modeli göstermişlerdir. Tespit edilen bantların 15, 38, 46, 48, 53, 55, 68, 74 ve 220 kDa ağırlığında proteinler olduğunu bildirmişlerdir. WB analizinde mono-spesifik antikolar, 15, 38, 48, 55, 74, 220 kDa'luk viral proteinlere spesifik olarak ve 53 kDa'lık viral proteine ise non-spesifik olarak reaksiyona girmiştir. Sonuçta, spesifik anti-NDV antikolarlarının hemaglutinin-nöraminidaz ve füzyon gibi glikoproteinlerle spesifik olarak reaksiyona girdiğini, ancak nükleoprotein ve matriks protein gibi internal proteinlerine tepki vermediğini ifade etmişlerdir.

Jayne ve Field, (2015) yaptıkları bir çalışmada, toplamda 21 tür olmak üzere 464 yarasadan orofarengeal swap numunesi toplamışlardır. Domuzların Reston Ebolavirus (REST)'unu serolojik ve virolojik yönden incelemişlerdir. WB ile anti-RESTV antikolarını üç yarasada tespit etmişlerdir.

Melo vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada, SARS-CoV-2'nin MERS-CoV, SARS-CoV-1, insan parainfluenza virüsü 3 (HPIV3), solunum sinsityal virüsü (RSV) gibi diğer solunum virüsleri ile transkripsiyonel yanıtını karşılaştırmak için, enfekte olmuş hücrelerden poli (A) RNA toplamışlar ve viral yükü tahmin etmek için RNA sekanslama (RNA-seq) gerçekleştirmişlerdir. Bazı hücrelerde düşük enfeksiyon oranının görülmesinin viral reseptör olan ACE2'nin düşük ekspresyonunun bir sonucu olduğunu varsaymışlardır. Daha sonra yaptıkları WB analizlerinin RNA-seq verilerini doğruladığını ve SARS-CoV-2 nükleokapsid (N) ekspresyonunun sadece ACE2'ye sahip hücrelerde gerçekleştiğini ifade etmişlerdir.

SONUÇ

Western Blot, temel araştırmalarda ve birçok klinik vakayı doğrulamak için kullanılan önemli bir tekniktir. WB diğer birçok immünolojik laboratuvar tekniklerinde elde edilemeyecek kadar değerli bilgiler kazanılmasını sağlar. Jel elektroforez aşamasında proteinler ağırlıklarına göre ayrıldığından ve spesifik olarak yönlendirilmiş bir antikor tarafından tespit edildiğinden, prosedür esas olarak bir hedef proteinin kimliğini doğrulamak üzerine çalışır. Spesifik bir proteinin varlığını hem büyüklüğüne göre hem de bir antikorun bağlanması yoluyla açıkça gösterebilme yeteneği sayesinde, hücrelerde protein ekspresyon seviyeleri değerlendirilebilir ve protein saflaştırma sırasında fraksiyonları izlenebilir. Benzer şekilde, bir hedef proteinin çeşitli dokulardan ekspresyonlarını karşılaştırmada veya belirli bir proteinin hastalığa veya ilaç tedavisine nasıl tepki verdiğini belirlemede önemli bir tekniktir. WB, hem araştırma hem de testlerin sonuçların doğrulanmasını sağlar. Gelecekteki çalışmalarda, WB antikor dizilerinden elde edilen sonuçların doğrulanmasında değer taşımaya ve proteomik araştırmalarda kullanıma uygun hale getirmeye devam edeceği ileri sürülebilir.

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Anonim,** (2009). [Polyacrylamide gel electrophoresis.](https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide) <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide> gel electrophoresis Erişim tarihi: 27.07.2020
- Anonim,** (2020a, 27 Temmuz). Western blot. https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot#:~:text=SDS%20is%20generally%20used%20as,%2C%20negatively%2C%20or%20neutrally%20charged.&text=The%20gel%20electrophoresis%20step%20is,the%20cross%2Dreactivity%20of%20antibodies
- Anonim,** (2020b, 27 Temmuz). Choosing a primary antibody or secondary antibody. <https://www.abcam.com/protocols/choosing-an-antibody>

- CUSABIO, (2018, 27 Temmuz 2020). Laboratory technical manual western blotting. Erişim adresi: [https://www.cusabio.com/protocols/Western Blotting \(WB\) Protocol.pdf](https://www.cusabio.com/protocols/Western Blotting (WB) Protocol.pdf)
- Flores, M.K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C.A., & López-Reyes, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigacion en Discapacidad*, 3, 128-137.
- Hassan, A.O., Vemula, S.V., Sharmal, A., Bangaril, D.S., Mishral, K.K., & Mitta, S.K. (2017). 155R is a novel structural protein of bovine adenovirus type 3, but it is not essential for virus replication. *Journal of General Virology*, 98, 749-753.
- He, Q., Chong, K.H., Chng, H.K., Leung, B., Ling, A.E., Wei, T., Chan, S.W., Ooi, E.E.I., & Kwang, J. (2004). Development of a Western blot assay for detection of antibodies against coronavirus causing severe acute respiratory syndrome. *American society for microbiology*, 11, 417-422.
- Hemmatzadeh, F., & Kazemimanesh, M. (2017). Detection of specific antigens of newcastle disease virus using an absorbed Western blotting method. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18, 92-96.
- Jayme, S.I., Field, H.E., Jong, C.D., Olival, K.J., Marsh, G., Tagtag, A.M., Hughes, T., Bucad, A.C., Barr, J., Azul, R.R., Retes, L.M., Foord, A., Yu, M., Cruz, M.S., Santos, I.J., Lim, T.M.S., Benigno, C.C., Epstein, J.H., Wang, L.F., Daszak, P., & Newman, S.H. (2015). Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats. *Virology Journal*, 12,107.
- Jensen, E.C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295, 369–371.
- Kennedy, M. (2005). Methodology in diagnostic virology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 8, 7–26.
- Goldberg, T.L., Chapman, C.A., Cameron, K., Saj, T., Karesh, W.B., Wolfe, N.D., Wong, S.W., Dubois, M.E., & Slifka, M. (2008). Serologic evidence for novel poxvirus in endangered red colobus monkeys, Western Uganda. *Emerging Infectious Disease*, 5, 801.
- Kurien, B.T., Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38, 283-293.
- Smith, A.G., Jayaram, J, Johnson, C.B., Ellis, E.A., Vitha, S., Collisson, E.W., & Holzenburg, A. (2009). *Improved Protein Detection Using Cold Microwave Technology*. In: Protein blotting and detection methods and protocols. Ed. Kurien, B.T., Scofield, R. (pp. 533-544). Human Press, Oklohama City, OK, USA.
- Li, G., Kawashima, H., Ogoose, A., Ariizumi, T., Xu, Y., Hotta, T., Urata, Y., Fujiwara, T., & Endo, N. (2011). Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137, 1037-1051.
- Liu, Q., Suresh, K.T., & Babiuk, L.A. (2001). Nuclear Localization of the ORF2 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Virology*, 285, 91–99.
- MacPhee, D.J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61, 171-177.
- Mahmood, T., & Yang, P.C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal Medical Sciences*. 9, 429–434.
- Martínez-Flores, K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C.A., & López-Reyes, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigacion en Discapacidad*, 3, 128-137.
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J.Á. (2013). *Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion*. In: Proteomics in Foods. Ed: Toldra F., Nollet L.M.L., (pp. 21-50). Springer, New York, USA.
- Martins, T.B., Woolstenhulme, R.D., Jaskowski, T.D., Hill, H.R., & Litwin, C.M. (2001). Comparison of four enzyme immunoassays with a Western blot assay for the determination of type-specific antibodies to herpes simplex virus. *Microbiology and Infectious Disease*, 2, 272-277.
- Melo, D.M., Payant, B., Liu, W.C., Uhl, S., Hoagland, D., Moller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T.T., Schwartz, R.E., Lim, J.K., Albrecht, R.A., & TenOever, B.R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.
- Memelink, J., Swords, K.M.M., Staeheln, L.A., & Hoge, J.H.C. (1994). Southern, Northern and Western blot analysis. *Plant Molecular Biology Manual*, 1, 1-23.
- Minafra, A., Casati, P., Elicio, V., Rowhani, A., Saldarelli, P., Savino, V., & Martelli, G.P. (2000). Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPa V) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Vitis*, 3, 115-118.
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L., & Price, N.C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 99-108.

- Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveld, M., Heim, D., Oesch, B., & Moser, M. (1999).** Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathologica*, 98, 437–443.
- Schägger H. (2006).** *Tricine-sds-page*. *Nature Protocols*, 1, 1-16.
- Siedler, B.S., Roloff, B.C., Sa, G.L.D., Neis, A., Conceição, F.R., Hartwig, D.D., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Campos, F.S., Roehe, P. M., Hartleben, C.P., & McBride, A.J.A. (2017).** Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. *Protein Expression and Purification*, 130, 21-27.
- Schlickeiser, S., & Pleyer, U. (2007).** *Western, Northern, and Southern Blotting*. In: *Basic Science Techniques in Clinical Practice*. Ed: Patel, H.R.H., Arya, M., Shergill, I.S. (pp. 48-57). Springer, London, England.
- Sosnovtsev, S.V., & Green, K.Y. (2000).** Identification and Genomic Mapping of the ORF3 and VPg Proteins in Feline Calicivirus Virions. *Virology*, 277, 193–203.
- Streckert, H.J., Bürüssow, H., Sure, K., & Werchau, H. (1986).** Antipeptide Antibodies Directed Against the Carboxy-Terminal Region of SV40 Structural Proteins VP2 and VP3. *Journal of Cellular Biochemistry*, 31, 277-287.
- Thiry, D., Mauroy, A., Saegerman, C., Licoppe, A., Fett, T., Thomas, I., Brochier, B., Thiry, E., & Linden, A. (2017).** Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 764–773.
- Whetstone, C.A., VanDerMaaten, M.J., & Miller, J.M. (1991).** A western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimentally inoculated cattle, sheep, and goats. *Archives of Virology*, 116, 119-131.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Tsoi, H-w., Chan, K-h., Wong, B.H., Che, X-y., Tam, V.K.P., Tam, S.C.F., Cheng, V.C.C., & Hung, I.F.N. (2004).** Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. *The Lancet*, 363, 841-845.