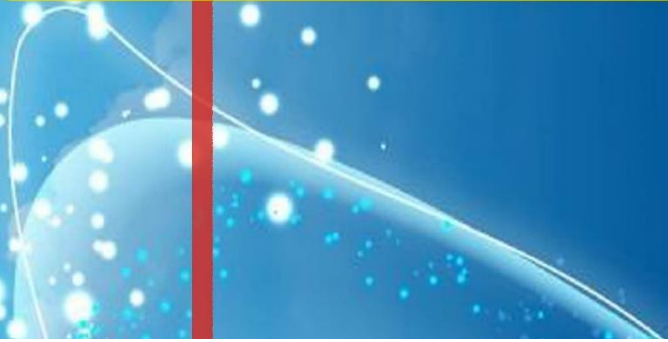
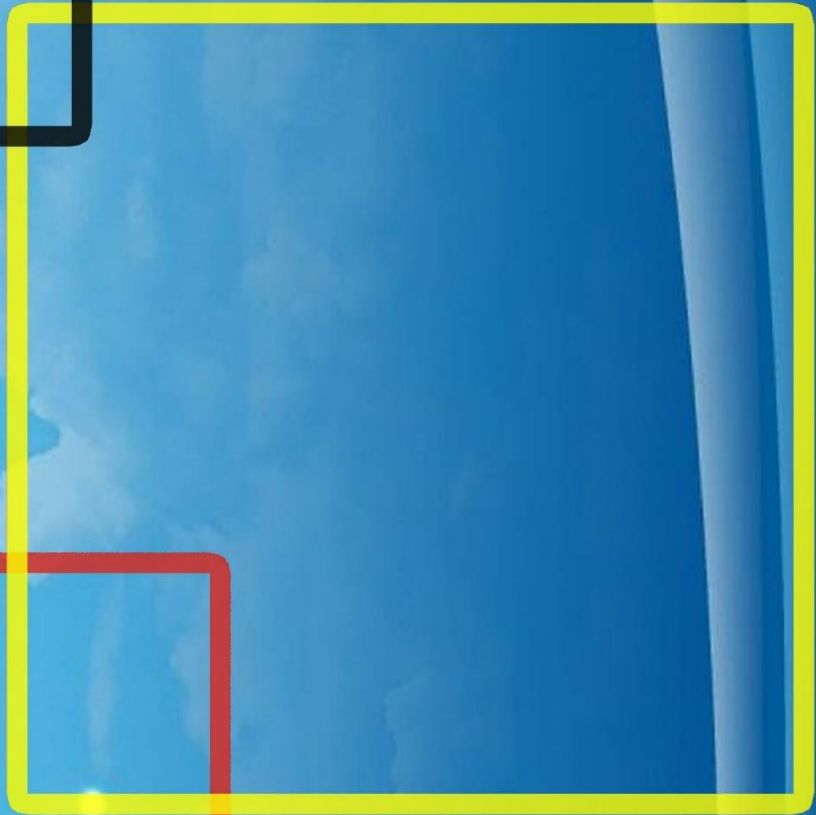
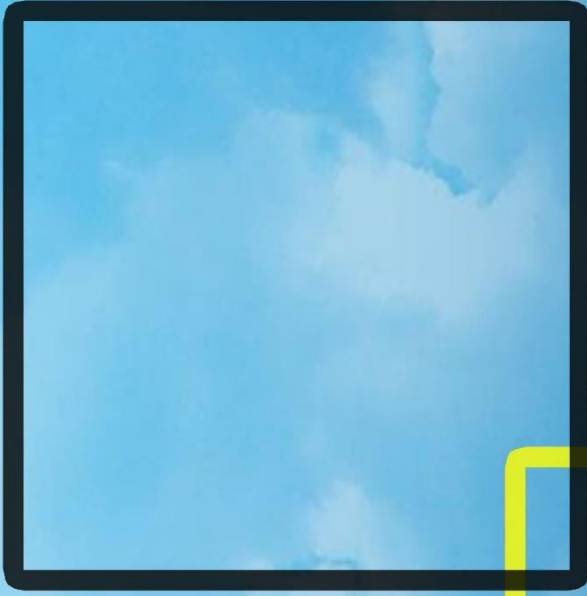




# VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2021 / Volume: 32 / Issue:1

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





March - 2021



# VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

## Owner

Prof. Dr. Musa GENÇCELEP (Dean)

## Editor-in Chief

Prof. Dr. Cumali ÖZKAN

Van YU, Faculty of Veterinary, Journal Editorial, 65080 - Campus / Van - Turkey

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27 e-mail: vfd@yyu.edu.tr

## Editors (Editorial Board)

Assoc. Prof. Dr. Bekir OĞUZ (Co-Editor)	Assoc. Prof. Dr. Adnan AYAN (Proof Quality Editor)
Assist. Prof. Dr. Caner KAYIKCI (Co-Editor)	Assist. Prof. Dr. Nebi ÇETİN (Proof Quality Editor)
Assist. Prof. Dr. Yağmur KUŞCU (Technical Editor)	Assoc. Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)
Assoc. Prof. Dr. Gamze ÇAKMAK (Language Editor)	Assoc. Prof. Dr. Leyla MİS (Section Editor)
Res. Assist. Dr. Mustafa ÖZBEK (Language Editor)	Assoc. Prof. Dr. Turan YAMAN (Section Editor)
Prof. Dr. Abdullah YEŞİLOVA (Statistical Editor)	Assist. Prof. Dr. Çağrı KALE (Section Editor)
Assist. Prof. Dr. Ahmet Fatih DEMİREL (Electronic Journal Editor)	Assist. Prof. Dr. Tuncer ÇAKMAK (Section Editor)
Res. Assist. Halil Cumhur YILMAZ (Electronic Journal Editor)	

## Publication Board

Dr. Abdullah KAYAR (Istanbul University-Cerrahpasa)	Dr. Jose Ramiro GONZALEZ MONTANA (University of Leon - Spain)
Dr. Ahmet Cihat ÖNER (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. M. Saleem AKHTAR (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)
Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU (Aksaray University)	Dr. Madalina G. ALBU KAYA (INCDDTP Institute - Romania)
Dr. Ali Rıza BABAOĞLU (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Memiş BOLACALI (Siirt University)
Dr. Ardavan Farhadi (Shantou University - China)	Dr. Mian Muhammed AWAİS (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)
Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas University - Kyrgyzstan)	Dr. Mojtaba RAEİSİ (Golestan university - Iran)
Dr. Axel WEHREND (Giessen University - Germany)	Dr. Murat GÜZEL (Ondokuz Mayıs University)
Dr. Aynur ŞİMŞEK (Dicle University)	Dr. Okan EKİM (Ankara University)
Dr. Bahattin ÇAK (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Omar ATROOZ (Mutah University - Jordan)
Dr. Behnam ROSTAMÍ (Zanjan University - Iran)	Dr. Omar BELLANDA (University of Republic - Uruguay)
Dr. Bengi ÇINAR KUL (Ankara University)	Dr. Orhan YILMAZ (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Cihat ÖZTÜRK (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Ornampai JAPA (Phayao University - Thailand)
Dr. Cristian MAGDAS (SAMV University - Romania)	Dr. Serkan YILDIRIM (Atatürk University)
Dr. Ehab ABU-BASHA (Jordan University (JUST) - Jordan)	Dr. Tahereh MOHAMMADABADI (Khuzestan University - Iran)
Dr. Ejaz AHMAD (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)	Dr. Tohid Rezaei TOPRAGGALEH (Tabriz University - Iran)
Dr. Faina SHAKİROVA (Kazan State Academy - Russia)	Dr. Ulaş ACARÖZ (Afyon Kocatepe University)
Dr. Feraye ESEN GURSEL (Istanbul-Cerrahpasa University) Dr.	Dr. Volkan KOŞAL (Van Yuzuncu Yil University)
Gert W. NIEBAUER (Vetmeduni Vienna - Austria)	Dr. Yeter DEĞER (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Golam KİBRİA (CVAS University - Bangladesh)	Dr. Yunus ÇETİN (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)
Dr. James M. MAY (Vanderbilt University - USA)	

## Advisory Board

Dr. Abdullah KAYA (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Nihat MERT (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Abeer F. El NAHAS (Alexandria University - Egypt)	Dr. Oğuz KUL (Kirikkale University)
Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU (Ankara University)	Dr. Ömer BEŞALTI (Ankara University)
Dr. Cenk YARDIMCI (Ondokuz Mayıs University)	Dr. Saadet BELHAN (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Durmuş Alpaslan KAYA (Hatay Mustafa Kemal University)	Dr. Suphi DENİZ (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Ecevit EYDURAN (Iğdır University)	Dr. Taylan AKSU (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Engin KENNERMAN (Uludag University)	Dr. Turan CİVELEK (Ayfyon Kocatepe University)
Dr. Füsün TEMAMOĞLU (Harran University)	Dr. Yakup Can SANCAK (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Hüseyin KARADAĞ (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Yılmaz ARAL (Ankara University)
Dr. Mecit YÖRÜK (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Zabit YENER (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Nazmi ATASOY (Van Yuzuncu Yil University)	

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: Van Vet J

All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanvetj>

Year	Volume	Issue
2021	32	1

This journal indexed / abstracted in Asos Index, Academic Resource Index (ResearchBib), CAB Abstracts, Chemical Abstract Service (CAS), EBSCOhost, Food Science & Technology Abstracts (FSTA), Google Scholar, Index Copernicus, J-Gate and Türkiye Atif Dizini



March - 2021

# VAN VETERINARY JOURNAL



This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

## Scientific Board of This Issue

Assoc. Prof. Dr. Sema USLU (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)  
Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ (Selcuk University)  
Assoc. Prof. Dr. Mehmet GÜVENÇ (Hatay Mustafa Kemal University)  
Assoc. Prof. Dr. Ramazan İLGÜN (Aksaray University)  
Prof. Dr. Mehmet AVCI (Harran University)  
Assoc. Prof. Dr. Oktay KAPLAN (Dicle University)  
Assist. Prof. Dr. Alper KOÇYİĞİT (Sivas Cumhuriyet University)  
Assoc. Prof. Dr. Muhammed Enes İNANÇ (B. Mehmet Akif Ersoy Univ.)  
Prof. Dr. Hasan İÇEN (Dicle University)

Res. Assist. Dr. Ömer Faruk KELEŞ (Van Yuzuncu Yil University)  
Assist. Prof. Dr. Volkan İPEK (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)  
Prof. Dr. Hidayet Metin ERDOĞAN (Aksaray University)  
Assoc. Prof. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU (Aksaray University)  
Prof. Dr. Bahtiyar BAKIR (Gazi University)  
Assoc. Prof. Dr. Cafer Tayer İŞLER (Hatay Mustafa Kemal University)  
Prof. Dr. Ali BUMİN (Ankara University)  
Prof. Dr. Zülfükar SARITAŞ (Afyon Kocatepe University)  
Prof. Dr. Kenan SEZER (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: Van Vet J  
All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanvetj>

Year	Volume	Issue
2021	32	1

This journal indexed / abstracted in Asos Index, Academic Resource Index (ResearchBib), CAB Abstracts, Chemical Abstract Service (CAS), EBSCOhost, Food Science & Technology Abstracts (FSTA), Google Scholar, Index Copernicus, J-Gate and Turkiye Atif Dizini

Original Articles

- **Öztop M, Çınar K, Demirbağ E.** Lectin Histochemistry of the Glycoconjugates in Partridge and Quail Conjunctival Epithelia (Keklik ve Bildırcın Konjunktiva Epitelindeki Glikokonjugatların Lektin Histokimyası) **1-6**
- **Kayrı V, Irmak M.** Siverek ve Muş Bölgelerinde Yeni Doğan Kuzularda Serum Selenyum, Bakır ve Kobalt Seviyelerinin Karşılaştırılması (Comparison of Serum Selenium, Copper and Cobalt Levels in Newborn Lambs in Siverek and Muş Regions) **7-12**
- **Bülbül T, Tatar M, Akalan MA, Atik H, Akosman MS, Demirkan AÇ, Türkmenoğlu İ, Özdemir V.** Nitrik Oksidin Yumurta Embriyosu Gelişimi Üzerine Etkisinin Morfolojik Olarak Belirlenmesi (Morphological Determination of the Effect of Nitric Oxide on Egg Embryo Development) **13-17**
- **Koşal V, Gülyüz F, Uslu BA.** Effect of Body Condition Score on Estrus-Ovulation Synchronization and Pregnancy in Cows and Heifers (İnek ve Düvelerde Vücut Kondisyon Skorunun Östrus-Ovulasyon Senkronizasyonu ve Gebelik Üzerine Etkisi) **18-21**
- **Karakurt E.** Immunohistochemical Investigation of Oxidative Stress-induced DNA Damage and Lipid Peroxidation in Bovine Papillomas and Fibropapillomas (Sığır Papillom ve Fibropapillomlarda Oksidatif Stres Kaynaklı DNA Hasarı ve Lipid Peroksidasyonun İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması) **22-27**
- **Naseri A, Sen I, Turgut K, Guzelbektes H.** Evaluation of Coagulation Abnormalities and Cardiac Biomarkers in Calves with Naturally Occurring Severe Sepsis or Septic Shock (Doğal Gelişen Şiddetli Sepsisli ve Septik Şoklu Buzağlarda Pıhtılaşma Bozuklukları ve Kardiyak Biyomarkırlarının Değerlendirilmesi) **28-32**
- **Yıldız F, Genççelep M.** Muş ve Yöresinde Koyun Piyeteninin İnsidansı ve Sağaltımı Üzerine Karşılaştırmalı Çalışmalar (Comparative Studies on the Treatment and Incidence of Footrot in Sheep in Muş and Its Region) **33-42**
- **Baldaz V, Kaya A.** Basit İndigesyonlu Sığırlarda Serum Metilmalonik Asit ve B12 Vitamini Düzeylerinin Tanısal Önemi (Diagnostic Importance of Methylmalonic Acid and Vitamin B12 in Cattle with Simple Indigestion) **43-48**
- **Sağlam M, Taban HM, Fadıl A.** Kedilerde Arka Ekstremitte Travmatik Lezyonlarının Dağılımı ve Sağaltımı Üzerine Klinik Çalışmalar (Clinical Studies on the Distribution and Treatment of Hind Limb Traumatic Lesions in Cats) **49-56**



## Lectin Histochemistry of the Glycoconjugates in Partridge and Quail Conjunctival Epithelia

Mustafa ÖZTOP<sup>1</sup>, \* Kenan ÇINAR<sup>2</sup> Emel DEMİRBAĞ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, 15030, Burdur, Turkey

<sup>2</sup> Suleyman Demirel University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, 32260, Isparta, Turkey

<sup>3</sup> Suleyman Demirel University, Isparta Vocational School of Health Services, Medical Services and Techniques Department, 32260, Isparta, Turkey

Received: 29.04.2019

Accepted: 31.05.2020

### ABSTRACT

The aim of this study was to examine the distribution of the glycoconjugates in conjunctival epithelium of partridge (*Alectoris chukar*) and quail (*Coturnix coturnix*). Eyelid samples harvested from both species were subjected to routine tissue processing. Lectin histochemistry was applied to sections in order to demonstrate the expression of glycoconjugates. Six different HRP-conjugated lectins (Con A, UEA-I, PNA, HPA, MAA and BSA I-B4) were used for this purpose. The conjunctival epithelium in both partridge and quail consisted of goblet cells and nongoblet cells. Both PNA and HPA bound, to varying degrees, to the goblet cells and nongoblet cells in conjunctival epithelium of partridge and quail. Con A reacted with nongoblet cells in both species. While partridge conjunctival goblet cells showed no reaction to Con A, quail conjunctival goblet cells had a very weak reaction to Con A. UEA-I did not bind to any cells in partridge, however, quail conjunctival goblet cells and nongoblet cells could react to UEA-I. In both species, conjunctival epithelial surfaces reacted with Con A, UEA-I, PNA and HPA. However, MAA and BSA I-B4 did not bind any cell and/or part in both partridge and quail conjunctiva. The present data suggest that composition of glycoconjugates could be different between goblet cells and nongoblet cells of these species, but it could be very similar at conjunctival epithelial surfaces on which the content of the goblet cells and nongoblet cells is released.

**Keywords:** *Conjunctiva, Glycoconjugates, Goblet cell, Lectin histochemistry, Partridge, Quail*

### ÖZ

## Keklik ve Bildircin Konjunktiva Epitelindeki Glikokonjugatların Lektin Histokimyası

Bu çalışmada keklik (*Alectoris chukar*) ve bildircin (*Coturnix coturnix*) konjunktiva epitelindeki glikokonjugatların dağılımının belirlenmesi amaçlandı. Her iki türden alınan gözkapığı örnekleri rutin doku takibi işlemlerinden geçildi. Glikokonjugat ekspresyonunu göstermek için alınan kesitlere lektin histokimyası uygulandı. Bu amaçla altı farklı HRP-bağlı lektin (Con A, UEA-I, PNA, HPA, MAA ve BSA I-B4) kullanıldı. Hem keklikte hem de bildircinde konjunktiva epiteli, goblet hücreleri ve goblet olmayan hücrelerden oluşmaktadır. Hem PNA hem de HPA değişen derecelerde bildircin ve keklik konjunktival goblet hücreleri ve goblet olmayan hücrelere bağlanmıştır. Con A her iki türde goblet olmayan hücreler ile reaksiyon vermiştir. Keklik konjunktival goblet hücreleri Con A'ya karşı herhangi bir reaksiyon göstermezken; bildircin konjunktival goblet hücreleri Con A'ya karşı çok zayıf reaksiyon göstermiştir. UEA-I, keklikte herhangi bir hücre tipine karşı reaksiyon göstermezken; bildircin konjunktival goblet hücreleri ve goblet olmayan hücreler UEA-I ile reaksiyon vermiştir. Her iki türde konjunktival epitelyal yüzeyler Con A, UEA-I, PNA ve HPA ile reaksiyon vermiştir. Bununla birlikte, MAA ve BSA I-B4 her iki türde herhangi bir hücre ve/veya kısma bağlanmamıştır. Bu sonuçlar glikokonjugat kompozisyonunun bu türlerin goblet ve goblet olmayan hücrelerinde farklı olabildiğini, ancak goblet ve goblet olmayan hücrelerin içeriklerinin salındığı konjunktival epitelyal yüzeylerde çok benzer olabildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bildircin, Glikokonjugat, Goblet hücresi, Keklik, Konjunktiva, Lektin histokimyası*



## INTRODUCTION

Conjunctiva is a biological shield of the eye thin (Gipson et al. 2004). It, together with the eyelids, acts as a physical barrier and protects the cornea from environmental allergens. It also properly distributes the tear film, serves as a source of immunological mediators that combat infection, and supplies epithelial cells and blood vessels for corneal healing (Lawton 1998; Stahl et al. 2002).

It consists of a surface epithelium that is unique among the non-keratinized, both stratified squamous type and stratified columnar type, with interspersed goblet cells (Gipson et al. 2004; Yanoff and Cameron 2011), and that is supported by delicate fibrovascular tissue that contains lymphatic channels (Yanoff and Cameron 2011). Within the epithelium are the mucin-secreting goblet cells, which discharge their contents onto the ocular surface (Stahl et al. 2002). Mucins give the corneal surface smoothness by intercalating the microvillus within the epithelium of the cornea (Reece 2005) and function to hold water on the surfaces of the epithelia synthesizing them. Mucins also serve to trap and remove particulates and pathogens from the ocular surface exposed mostly to the outside environment (Gipson and Argueso 2003).

The surface of the eye is covered by a tear film held by a wet-surfaced, stratified, corneal and conjunctival epithelia. The major origin of the tear film mucus glycoproteins has been thought to be goblet cells of the conjunctiva whose morphological and histochemical features were described in great detail (Gipson and Argueso 2003). Maintenance of tear film on the ocular surface, lubrication and provision of a pathogen barrier on this wet surface is mediated by the mucins (Gipson and Argueso 2003). The possible hypothesis regarding mucin function and tear film structure is that the secreted mucins create a hydrophilic blanket to clear debris and pathogens. Mucins impede cell-cell and cell-pathogen adherence. The expression and glycosylation of mucins are affected by drying, keratinizing ocular surface diseases (Komatsu et al. 1997; Argueso et al. 2003; Gipson and Argueso 2003).

Lectins possess a specific binding affinity for the sugar residues of glycoconjugates, so they are versatile probes for examining the incidence and distribution of glycoconjugates in various tissues (Spicer and Schulte 1992). Lectin histochemistry has been successfully employed to evaluate the composition of the glycoconjugates in the eye of some mammals such as human (Hietanen et al. 1995; Iwakiri et al. 1997; Shatos et al. 2001; Mochizuki et al. 2010; Doughty 2012), rat (Ríos et al. 2000), rabbit (Maeda et al. 1998), guinea pig (Latkovic 1991). However, very little information is available on the histochemistry and lectin-based histochemistry of glycoconjugates present in the avian eye.

Therefore, we here aimed to analyze the glycoconjugate distribution in conjunctival goblet cells and non-goblet cells of partridge (*Alectoris chukar*) and quail (*Coturnix coturnix*) using the lectins Con A, UEA-I, PNA, HPA, MAA and BSA I-B4.

## MATERIALS and METHODS

### Study Protocol

The study was approved by the Animal Care and Usage Committee of Süleyman Demirel University (approval date: 29.11.2011, Decision No: B.30.2.SDÜ.0.05.06.00-131). It was in accordance with the guidelines of the International Association for the Study of Pain.

## Histological Specimens

A total of 8 adult specimens, 4 for *Alectoris chukar* and 4 for *Coturnix coturnix*, were used in the lectin histochemical study. Adult birds were anesthetized intramuscularly with ketamine hydrochloride (50 mg/kg). Decapitation was performed under deep anesthesia. Eyelids were excised. The specimens were fixed in Bouin's fluid for 18h at room temperature, as described previously (Öztop et al. 2018). Then, they were washed three times in 50% of alcohol, followed by dehydration in a series of ascending ethanol, and cleared in xylene and embedded in paraffin. Sections at 5-6 µm thickness were cut and gathered on albumin-coated slides.

## Lectin Histochemistry

After deparaffinizing in xylene and rehydrating in ethanol, the sections were rinsed in distilled water. Lectin histochemistry (LHC) was performed, as described previously (Çinar et al. 2016). The sections were incubated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) in absolute methanol for 10 min at room temperature so as to quench endogenous peroxidase activity. After washing in distilled water and washed in 0.01 M PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7.2) containing 1% BSA (Bovine Serum Albumin), the sections were then incubated with a panel of Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated lectins for 30 min at room temperature and washed in PBS.

The HRP-conjugated lectins, their binding specificities and optimal concentrations used in this study were listed in Table 1. The lectin binding sites were then visualized by DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) for 10 min at room temperature and appeared as brown or dark-brown colors. Slides developed with DAB were washed in distilled water, dehydrated in ascending grades of alcohol and cleared in xylol, permanently mounted with entellan and examined under a light microscope (Olympus, CX 41) and photographed using a digital camera mounted on the microscope.

**Table 1.** Sources, abbreviations, carbohydrate binding specificities and concentrations of lectins used in the study.

Lectins	Carbohydrate binding specificity	Concentration (µg/ml)
Con A	α-D-mannosyl, α-D-glucosyl	50 µg/ml
UEA-1	α-L-Fucose	25 µg/ml
PNA	β-Galactose-N-acetylgalactosamine	20 µg/ml
HPA	N-acetyl-D-galactosamine	10 µg/ml
MAA	sialic acid-α(2,3)-galactose	50 µg/ml
BSA I-B4	α-D-galactosyl, N-acetyl-α-D-galactosaminyl	25 µg/ml

## RESULTS

With the exception of the stratified non-keratinized epithelium at the initial part of the conjunctiva in partridge and quail, the goblet cells of conjunctiva were clustered in other epithelial parts and they reacted with the lectins in various degrees. The conjunctival epithelial surfaces were more positive than goblet cells. The positivity was also more prominent in non-goblet cells than in goblet cells.

Reaction intensity was generally stronger at conjunctival epithelial surfaces than in goblet and non-goblet cells. Micrographs depict the reactions of the partridge and quail conjunctival epithelia with the lectins Con A, UEA-I, PNA, HPA, MAA and BSA I-B4 (Figures 1-7). The labeling pattern in the conjunctival epithelia varied significantly with the lectins used. Table 2 summarizes the results.

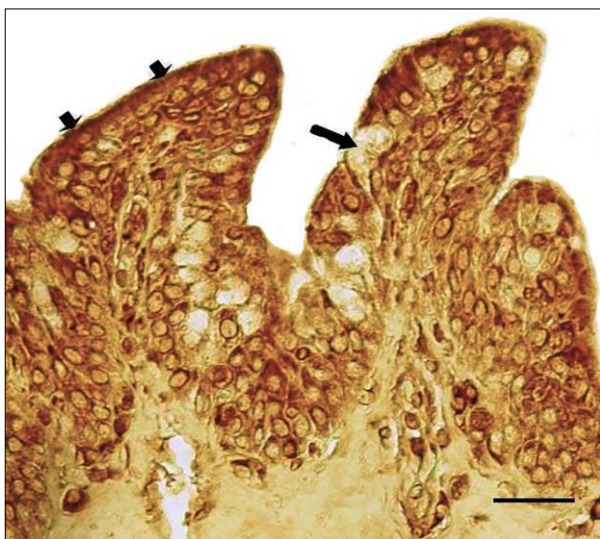
**Table 2.** Lectin-binding pattern in partridge and quail conjunctival epithelia.

Lectins	Partridge			Quail		
	GC	NGC	ES	GC	NGC	ES
Con A	0	3	4-5	0-1	3	4-5
UEA-I	0	0	2	2-4	1	2
PNA	1-4	1	4	3-5	1	2
HPA	1-5*	3-4	4-5	2-5	3	3-4
MAA	0	0	0	0	0	0
BSA I-B <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0

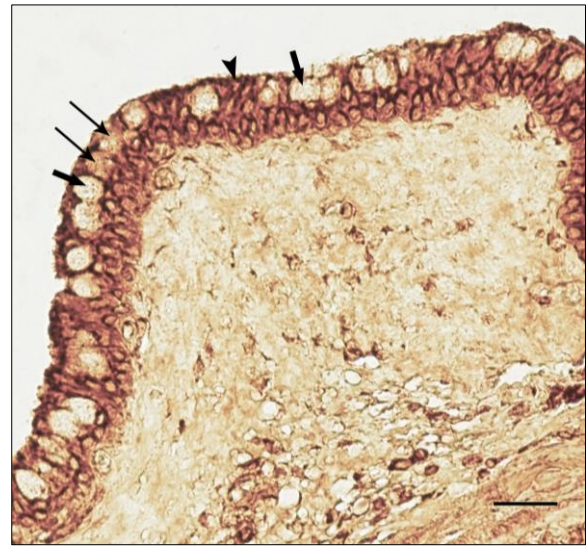
\*1-5 indicates that reaction intensity ranged from very weak to very strong. Negative, 0; Very weak, 1; Weak, 2; Mediate, 3; Strong, 4; Very Strong, 5. GC: Goblet cell; NGC: Non-goblet cells; ES: Epithelial surfaces.

Con A was bound strongly to the conjunctival surfaces (Figure 1 and 2) of both avian species. While there seemed to be no positive reactions in partridge conjunctival goblet cells (Figure 1); very weak reactions were found in some goblet cells, without being positive reactions in most of quail conjunctival goblet cells (Figure 2).

UEA-I was bound moderately to the conjunctival epithelial surfaces in *Alectoris chukar* whereas conjunctival goblet cells, non-goblet cells did not show any reactions against this lectin. In *Coturnix coturnix*, weak, moderate and strong positive reactions were found in the conjunctival epithelial goblet cells (Figure 3). Positive reactions were also discernible at the conjunctival epithelial surfaces.



**Figure 1.** Con A staining in partridge conjunctiva. Conjunctival surfaces (short arrows), goblet cells (long arrow). LHC, 40x.



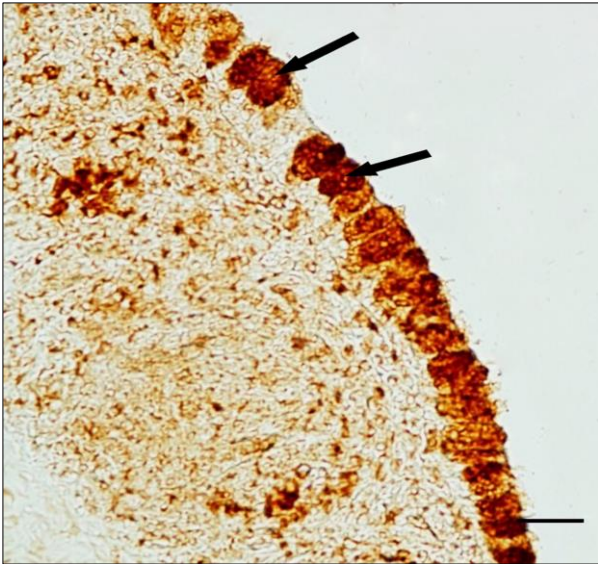
**Figure 2.** Con A staining in quail conjunctiva. Conjunctival surfaces (arrowhead), nonreactive goblet cells (thick arrows), reactive goblet cells (thin arrows). LHC, 40x.



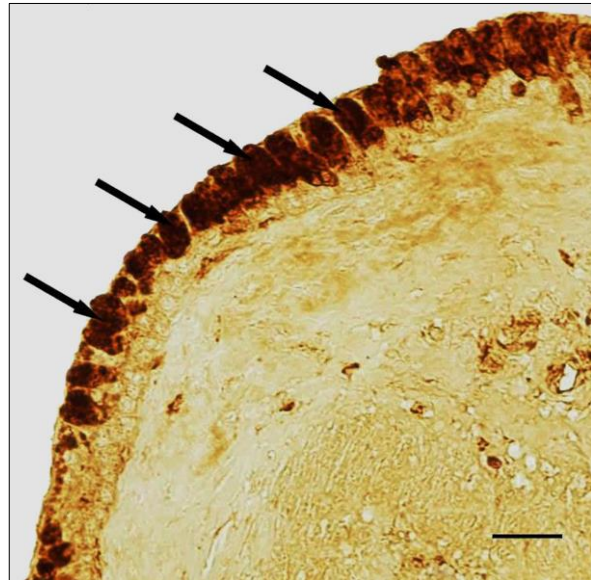
**Figure 3.** UEA- I staining in quail conjunctiva. Reactive goblet cells (arrows). LHC, 40x.

PNA was bound strongly to the partridge conjunctival epithelial surfaces while very weak positive reactions were found in cells on quail conjunctival epithelial surfaces. Partridge conjunctival goblet cells showed different positive reactions from very weak to strong, with being mostly strong reactions (Figure 4). On the other hand, quail conjunctival goblet cells displayed moderate, strong and/or stronger positive reactions (Figure 5).

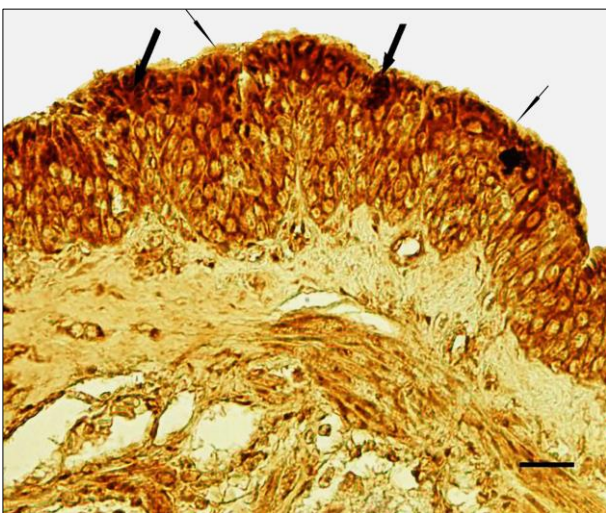
HPA was bound strongly to the conjunctival epithelial surfaces and epithelial cells in quail and partridge. Both quail (Figure 6) and partridge (Figure 7) conjunctival goblet cells exhibited positive reactions in different intensities from weak to stronger. Weaker positive reactions were also found in partridge conjunctival goblet cells than in quail conjunctival goblet cells. Any cells or surfaces present in conjunctival epithelia studied in quail and partridge did not react to both MAA and BSA I-B4.



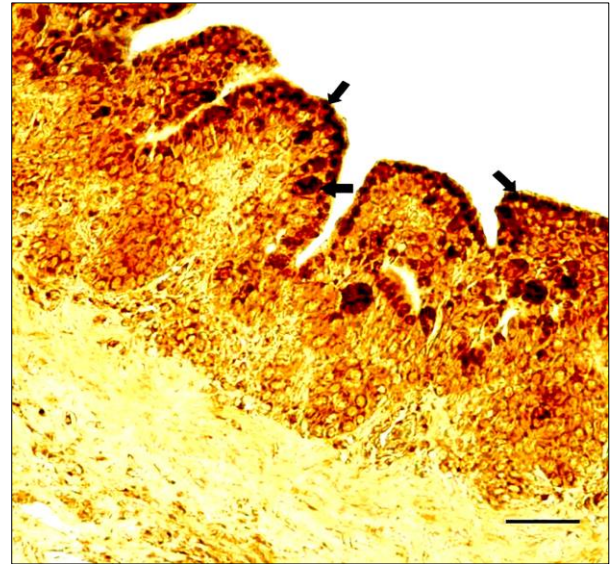
**Figure 4.** PNA staining in partridge conjunctiva. Reactive goblet cells (arrows). LHC, 40x.



**Figure 5.** PNA staining in quail conjunctiva. Reactive goblet cells (arrows). LHC, 40x.



**Figure 6.** HPA staining in quail conjunctiva. Reactive goblet cells (thick arrows), conjunctival surfaces (thin arrows). LHC, 40x.



**Figure 7.** HPA staining in partridge conjunctiva. Reactive goblet cells (arrows). LHC, 40x.

## DISCUSSION and CONCLUSION

This study is the first report that investigates the existence of glycoconjugates in the partridge and quail conjunctival epithelia by lectin-based histochemistry. In both species, HRP-conjugated lectins bound more avidly to conjunctival epithelial surfaces than to both goblet cells and non-goblet cells, indicating that the content of the goblet cells and non-goblet cells is indeed released on the conjunctival surface. This is concordant with findings in human conjunctiva (Reid and Clamp 1978). Besides, in both partridge and quail goblet cells, the intensity of lectin binding varied from cell to cell within the same cluster, suggesting that the cells were in different stages of cell differentiation and/or in different stages of the mucin secretion cycle.

With a few exceptions, the prominent reaction of the partridge and quail conjunctival tissues with Con A, UEA-I, PNA, and PNA is agreeable with what would be expected for glycoconjugate types with different histochemical properties and on the basis of the sugar-binding specificity of the lectins (Table 1), they are likely to produce  $\alpha$ -D-mannosyl,  $\alpha$ -D-glucosyl,  $\beta$ -Galactose-N-acetylgalactosamine,  $\alpha$ -L-Fucose, and N-acetyl-D-galactosamine. Thus, conjunctival glycoconjugates have a species-specific glycan expression pattern. As a high percentage of sialylated structures are found in human conjunctival glycoconjugates, fucosylated structures predominate in rabbit and dog conjunctival glycoconjugates (Royle et al. 2008). On the basis of at least the lectins used in this study, we noted that the glycoconjugates with galactosylated and N-acetylated moieties occur in both partridge and quail conjunctiva, and those with fucosylated moieties are more dominant in quail conjunctiva than in partridge conjunctiva. We did, however, not discerned any glycoconjugates with sialylated moieties in the conjunctival epithelium of both species.

Maeda et al. (1998) indicated that Con-A is specifically bound to the non-goblet epithelial cells, but do not react with the goblet cells. Our present findings concerning Concanavalin A, which has an affinity for mannose (Lis et al. 1970), are almost completely consistent with the results of Maeda et al. (1998), except for little differences observed in quail conjunctival goblet cells that reacted



weakly with Con-A. Goblet cells and epithelial surfaces of human conjunctiva did, however, not show any definite reaction to Con A (Kawano et al. 1984). These results indicate that the conjunctival glycocalyx bears a striking resemblance between at least rabbit, partridge and quail, but not human. Hietanen et al. (1995), however, observed that the superficial conjunctival epithelium reacted consistently with concanavalin A in the human conjunctiva of patients with and without exfoliation syndrome.

Maeda et al. (1998) showed that UEA-I recognizes the L-fucose moiety of glycoconjugates at the external surface of the rabbit conjunctiva, and any positive reaction to this lectin is not found in other parts of the conjunctiva and in the vasculature in the substantia propria of the conjunctiva. While our results in partridge are in general agreement with Maeda et al. (1998), our findings in quail conjunctiva are almost completely contrary to those in human conjunctiva (Kawano et al. 1984) and those in rabbit conjunctiva (Maeda et al. 1998). It can be inferred from these results that the glycocalyx of the human, rabbit and partridge conjunctiva shows a similar labeling pattern with UEA-I.

It has been found that human conjunctival goblet cells in vitro react avidly to HPA (Şeftalioğlu et al. 1996) and both goblet cells in vitro and in rat conjunctival tissue show positive reaction to UEA-1 and HPA and no reaction to BSA I-B4 (Shatos et al. 2001). These results are coherent with our HPA positive and BSA I-B4 negative findings in partridge and quail conjunctival goblet cells. Besides, in the present study, whereas positive reaction in quail conjunctival goblet cells is observed with UEA-I, any reaction in partridge conjunctival goblet cells do not discern with UEA-I.

Dartt et al. (1996) and Ríos et al. (1999) indicated that the lectins UEA-I and HPA selectively recognize carbohydrates in secretory products of the adult rat conjunctival goblet cells. Since then, Ríos et al. (2000) observed that goblet cells at different developmental stages react with UEA-I and HPA in various degrees. Their results suggest that the immature goblet cells differentiating during eyelid opening conjunctiva do not express the same carbohydrates in their secretory products as do mature goblet cells. Our present results, which show the reaction to UEA-I and HPA at different intensities from weak to strong in quail conjunctival goblet cells with the exception of no reaction to UEA-I in partridge conjunctival goblet cells, are concordant with literature reports that UEA-I and HPA positive reactions are present in rat conjunctival goblet cells (Dartt et al. 1996; Ríos et al. 1999, 2000).

Kawano et al. (1984) and Hietanen et al. (1995) observed that human conjunctival goblet cells and epithelial surfaces are labeled with PNA intensely. Wells et al. (1988) noticed that goblet cells and epithelial surfaces in normal and pathologic human conjunctival tissues react positively to PNA and non-goblet cells to PNA after treatment with neuraminidase. Our observations conform to those reported in human conjunctiva (Kawano et al. 1984; Wells et al. 1988).

Iwakiri et al. (1997) indicated that MAA binds avidly to human conjunctival goblet cells. This is inconsistent with present findings in partridge and quail conjunctival goblet cells. These observations suggested that the terminal galactosyl residue of the glycoconjugates is alpha 2,3-sialylated in human conjunctival goblet cells, and any sialylated residues do not find in both partridge and quail conjunctival goblet cells. In this regard, the sialylation can be an important process that may modulate immune

interactions in conjunctival tissue, perhaps in conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) or the follicle-associated epithelium of the conjunctiva. Less is known about the glycocalyx above the follicle-associated epithelium of the conjunctiva. It is important to note that M cell in the guinea pig conjunctiva is the only epithelial cell type that expresses  $\alpha(2-3)$ -linked sialic acid on the apical surface (Liu et al. 2005). Therefore, it is most likely to find the M cell in the human conjunctiva because the lectin MAA recognizes sialic acid- $\alpha(2,3)$ -galactose in human conjunctival goblet cells (Iwakiri et al. 1997) and M-cell in the guinea pig conjunctiva is the only epithelial cell type that expresses sialic acid. Therefore, it remains to be seen whether the M-cell is present in partridge and quail conjunctiva, in particular, based on using model organism of *Coturnix coturnix*.

In conclusion, the positive reaction to these lectins in both partridge and quail varies from weak to strong and appears to be related to the levels of mucins associated with the cell at the time it is processed for lectin histochemistry. These mucins cover the surface cells of the conjunctiva and cornea. Mucins present in the tear film may play crucial roles in keeping corneal and conjunctival surfaces wet and in the defense of the ocular surface against bactericidal, virucidal agents and/or other infectious agents. There can be an alternation either in glycoconjugate distribution or glycosylation, fucosylation, acetylation or sialylation patterns of glycoconjugates on the conjunctival epithelial surfaces, in conjunctival goblet cells and non-goblet cells in various eye diseases, including conjunctivitis and dry eye. It is considered that present findings may be useful in the search for the importance of glycoconjugates in order to elucidate the pathophysiology and pathogenesis of eye diseases.

---

## CONFLICTS of INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

---

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: KÇ, ED  
 Design: KÇ, ED  
 Supervision / Consultancy: KÇ  
 Data Collection and / or Processing: MÖ, ED  
 Analysis and / or Interpretation: MÖ, KÇ  
 Literature Review: MÖ  
 Writing the Article: MÖ  
 Critical Review: MÖ, KÇ, ED

---

## REFERENCES

- Argueso P, Tisdale A, Mandel U, Letko E, Foster CS, Gipson IK (2003). The cell-layer- and cell-type-specific distribution of GalNAc-transferases in the ocular surface epithelia is altered during keratinization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 86-92.
- Çinar K, Öztop M, Özkarasu B (2016). Glycoconjugate composition of ovine parotid glands elucidated by lectins. *J Morphol Sci*, 33(1), 8-13.
- Dartt DA, Kessler TL, Chung E, Zieske JD (1996). Vasoactive intestinal peptide-stimulated glycoconjugate secretion from conjunctival goblet cells. *Exp Eye Res*, 63, 27-34.
- Doughty MJ (2012). Goblet cells of the normal human bulbar conjunctiva and their assessment by impression cytology sampling. *Ocul Surf*, 10(3), 149-169.
- Gipson IK, Argueso P (2003). Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol*, 231, 1-49.
- Hietanen J, Uusitalo M, Tarkkanen A, Kivela T (1995). Lectin and immunohistochemical comparison of glycoconjugates in the conjunctiva of patients with and without exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol*, 79, 467-472.

- Iwakiri N, Uehara F, Ohba N, Tsuyama S, Murata F (1997).** Lectin histochemistry of the glycoconjugates in conjunctival goblet cells. *Jpn Ophthalmol Soc*, 101, 83-86.
- Kawano K, Uehara F, Sameshima M, Ohba N (1984).** Application of lectins for detection of goblet cell carbohydrates of the Human Conjunctiva. *Exp Eye Res*, 38, 439-447.
- Latkovic S (1991).** Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the surface of the guinea pig conjunctival epithelium. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 229, 153-156.
- Lawton A (1998).** Structure and function of the eyelids and conjunctiva. In: The Cornea, Kaufman H, Barron B, McDonald M (Ed), 51-61, Butterworth-Heinemann, Boston.
- Lis H, Sela B, Sachs L, Sharon N (1970).** Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. *Biochim Biophys Acta*, 211, 582-585.
- Liu H, Meagher CK, Moore CP, Phillips TE (2005).** M Cells in the follicle-associated epithelium of the rabbit conjunctiva preferentially bind and translocate latex beads. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (11), 4217-4223.
- Maeda S, Ishikawa M, Abe T, Sakuragi S (1998).** Lectin cytochemistry of the rabbit conjunctiva and lacrimal sac. *Jpn J Ophthalmol*, 42, 443-449.
- Öztop M, Cinar K, Turk S (2018).** Immunolocalization of natriuretic peptides and their receptors in goat (*Capra hircus*) heart. *Biotech Histochem*, 93(6), 389-404.
- Reid L, Clamp JR (1978).** The biochemical and histochemical nomenclature of mucus. *Br Med Bull*, 34(1), 5-8.
- Ríos JD, Zoukhri D, Rawe IM, Hodges RR, Zieske JD, Dartt DA (1999).** Immunolocalization of muscarinic and VIP receptor subtypes and their role in stimulating goblet cell secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1102-1111.
- Ríos JD, Forde K, Diebold Y, Lightman J, Zieske JD, Dartt DA (2000).** Development of conjunctival goblet cells and their neuroreceptor subtype expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2127-2137.
- Royle L, Matthews E, Corfield A, Berry M, Rudd PM, Dwek RA, Carrington SD (2008).** Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconj J*, 25, 763-773.
- Shatos MA, Ríos JD, Tepavcevic V, Kano H, Hodges R, Dartt DA (2001).** Isolation, characterization and propagation of rat conjunctival goblet cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1455-1464.
- Spicer SS, Schulte BA (1992).** Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem*, 40, 1-38.
- Stahl JL, Cook EB, Barney NP, Graziano FM (2002).** Pathophysiology of ocular allergy: The roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2, 332-339.
- Şeftalioglu A, Tezel G, Tezel T, Alabay B (1993).** Ultrastructural demonstration of *Helix pomatia* lectin-binding sites in goblet cells of human conjunctiva. *J Islamic Acad Sci*, 6(1), 46-51.
- Wells PA, DeSiena-Shaw C, Rice B, Foster CS (1988).** Detection of ocular mucus in normal human conjunctiva and conjunctiva from patients with cicatricial pemphigoid using lectin probes and histochemical techniques. *Exp Eye Res*, 46(4), 485-497.
- Yanoff M, Cameron D (2011).** Diseases of the Visual System. In: Goldman's Cecil Medicine, Lee G, Schafer AI (Ed), 2426-2442, Elsevier-Saunders, Philadelphia.



## Comparison of Serum Selenium, Copper and Cobalt Levels in Newborn Lambs in Siverek and Muş Regions

Veysi KAYRI\*<sup>ID</sup> Mehmet IRMAK<sup>ID</sup>

*Muş Alparslan University, Faculty of Applied Sciences, Animal Production and Technologies Department, 49210, Muş, Türkiye*

Received: 11.09.2020

Accepted: 16.02.2021

### ABSTRACT

In this study, serum selenium (Se), copper (Cu) and cobalt (Co) values were investigated in 20-30 day-old lambs born from healthy akkaraman sheep raised in pasture conditions in Siverek and Muş regions, not given supplementary feed and showing no clinical symptoms. 18 lambs, 9 females and 9 males, and 36 lambs in total were used for research. Mineral matter analyzes were determined by Atomic Absorption Spectrometer. While there was no difference between the regions in terms of serum copper levels ( $P>0.05$ ); significant differences were found between serum Se and Co values ( $P<0.05$ ). While average serum selenium level was found to be high in both regions, serum Cu level was found to be lower than the reference values. Serum Co value was found between normal values in both Siverek and Muş. As a result, it was concluded that the lambs should be given Cu support during pasture-based breeding in Siverek and Muş.

**Keywords:** Cobalt, Copper, Selenium

### ÖZ

## Siverek ve Muş Bölgelerinde Yeni Doğan Kuzularda Serum Selenyum, Bakır ve Kobalt Seviyelerinin Karşılaştırılması

Bu çalışmada Siverek ve Muş bölgelerinde mera koşullarında yetiştirilen, takviye yem verilmeyen ve klinik belirti göstermeyen sağlıklı akkaraman ırkı koyunlardan doğan 20-30 günlük kuzulardaki serum selenyum (Se), bakır (Cu) ve kobalt (Co) değerleri araştırıldı. Araştırılmak üzere her bölgeden 9 dişi 9 erkek olmak üzere 18, toplamda ise 36 kuzu kullanıldı. Mineral madde analizleri Atomik Absorbsiyon Spektrometrede tayin edildi. Bölgeler arasında serum Cu düzeyleri bakımından farklılık bulunmazken ( $P>0.05$ ); serum Se ve Co değerleri arasında önemli farklılıklar tespit edildi ( $P<0.05$ ). Her iki bölgede de ortalama serum Se düzeyi yüksek bulunurken, serum Cu düzeyi referans değerlerden düşük olarak bulundu. Serum Co değeri ise hem Siverek hem de Muş'ta normal değerler arasında tespit edildi. Sonuç olarak, Siverek ve Muş'ta meraya dayalı yetiştiriciliğin yapıldığı dönemde kuzulara Cu desteği verilmesi gerektiği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır, Kobalt, Selenyum

### GİRİŞ

Mineraller, canlı organizmada düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen, enzim aktivite, hücrede ozmotik basıncın regülasyonu, hormonal aktivite, kollagen oluşumu, oksijenin taşınması, fertilitate, canlı ağırlık kazancı ve hastalıkların önlenmesi gibi birçok fizyolojik aktivitenin devamlılığı için önemli roller taşımaktadırlar. Mineral maddelerin eksikliğinde beslenmeye bağlı hastalıklar ortaya çıkmakta ve yetiştirici açısından büyük ekonomik kayıplar gerçekleşmektedir (Underwood ve Sutt 1999).

Keşfedildikten uzun bir süre sonrasında kadar karsinojenik bir mineral olarak tanımlanan Se, ilk kez 1957 yılında canlı organizma için faydalı olduğu saptanmıştır. Se, antioksidan (Rayman 2000), antiinflamatuvar (Aaseth ve ark. 2016), antimutajenik (Peng ve ark. 2016), antikarsinojenik (Ahmad ve ark. 2015), kemopreventif (Combs ve ark. 1998) ve antibakteriyel (Cihalova ve ark. 2015) özellikleri

olan bir iz elementtir. Se bütün bu özelliklerinin yanı sıra fizyolojik açıdan önemli bir dizi sürece katılan selenoproteinlerin ayrılmaz bir bileşenidir (Pascual ve Aranda 2013). Esansiyel bir mineral olan Se, bitkiler tarafından topraktan emilirler. İnsan ve hayvanların bitkileri tüketmesi ile Se ihtiyacı karşılanmaktadır (Bağdaş ve Yıldız 2004). Topraktaki Se seviyesi 0.2 ppm dolaylarındadır. Se yönünden fakir meralarda otlayan koyunlardan doğan kuzularda beyaz kas hastalığı insidansı yükselmektedir (Kurt ve ark. 2001). Se içeriği düşük olan topraklarda yetişen bitkilerin tüketilmesi hayvanların Se ihtiyacını karşılamaya yetmemektedir. Ayrıca toprak pH'nın asidik olması ve toprakta fazla miktarda sülfat olması Se'nin bitkiye geçişini kısıtlamaktadır (Dabak ve ark. 2002). Se rumen mikroorganizmaları tarafından organizmanın kullanamayacağı formlara indirgendiğinden dolayı ruminantlarda monogastrik hayvanlara göre emilimi daha düşük olmaktadır. Se ve E vitamini



eksikliğinin aynı anda görülmesi sonucunda beyaz kas hastalığı (white muscle disease), infertilite, abort, metritis, zayıflık gecikmesi veya anöstrüs, immün sistemin desteklenmesi gibi semptomlar gözlenmektedir (Bozena ve ark. 2017). Tiroid hormonu canlılarda büyüme, gelişme, enerji metabolizması, verim miktarı gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Se eksikliğinde, tiroid hormonlarından T4 ve TSH hormonu yükselirken, T3 hormonunun düştüğü yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Gustavo ve ark. 2018).

Beyaz kas hastalığı, dünyanın birçok bölgesinde görülen Se ve E vitaminin eksikliğinde ortaya çıkan beslenmeye bağlı bir hastalıktır (Gustavo ve ark. 2018). Ülkemizde özellikle Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülen beyaz kas hastalığı, kalp kası ve iskelet kaslarında dejenerasyonlara yol açarak kuzularda ölümlere neden olan bir hastalıktır. Kuzularda başlarda harekette güçlük, ayakta duramama, kısa ve dik adımlar, beli kambur tutma semptomları ile görülen beyaz kas hastalığı ilerleyen süreçlerde paralize yol açmaktadır. Beyaz kas hastalığına yakalanan kuzuların daha çok pnömoni, kalp yetmezliği ve ağıltan öldüğü rapor edilmiştir (Bildik ve ark. 2007). Fazla miktarda alınan Se solunum, terleme, idrar ve defekasyonla vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Eren 2009).

Cu, askorbit asit, oksidaz, tirozinaz, laktoz ve monoamin oksidaz gibi yükseltgeyici enzimlerin bir bileşeni olarak bitki ve hayvan organizmasında eser miktarda bulunmaktadır. Cu, Canlı organizmadaki fizyolojik ve biyokimyasal aktivitelerin devamlılığı için gereklidir (Malkin ve Malmstrom 1970). Bilinen en eski elementlerden olan Cu, 1928 yılında dışarıdan alınması zorunlu olan iz element olarak kabul edilmiştir. Cu, yağ metabolizmasında, kemik dokusu oluşumunda, kalp kasında, bağ doku gelişiminde, omurilikte miyelin yapımında, fertilizasyonda, yapığı oluşumunda ve sinir sisteminin gelişiminde, doku pigmentasyonunda, bağışıklık sisteminde ve dokulardaki oksidasyon olaylarında önemli görevler üstlenmenin yanı sıra kan yapımı boyunca demir'le (Fe) beraber aktivite göstermektedir (Shehata ve ark. 2019). Ayrıca Cu, Fe'nin absorpsiyonunda, dokulardan taşınmasında ve hemogloblin yapımına katılmasında görev almaktadır (Al Busadah 2003; Jung-Heun ve James 2018). Serumdan ayrılan Cu, diğer birçok dokuda olduğu gibi, kıl ve yün oluşumunda da etki göstermektedir. Bu nedenle yün ve kılların mineral düzeylerinin belirlenmesiyle hayvanın mineral seviyesi hakkında fikir yürütülebilir (Erika ve ark. 2020). Emilimi ince bağırsaklarda gerçekleşen Cu'nun yaklaşık %5'i dolaşım sistemine katılmaktadır. Kandaki Cu'nun yaklaşık %60'ı serumda, %40'ı eritrositlerde ve çok az bir kısmı lökositlerde bulunmaktadır (Çimtay ve ark. 2000). Canlı organizmadaki Cu düzeyi mevsim, ırk, yaş, coğrafik farklılıklar, gebelik ve süt verimi gibi farklı parametrelere göre farklılık gösterebilmektedir (Yalçınkaya ve ark. 2010; Ming ve ark. 2018).

Rasyonla yeterli miktarda Cu alınamaması veya rasyondaki Cu absorpsiyonunun çeşitli nedenlerle kısıtlı olmasıyla şekillenen Cu yetersizliği, subklinik veya klinik olarak ortaya çıkmakta ve daha çok ekstansif yetiştiricilik yapılan sürülerde görülmektedir. Rasyonla yeterli düzeyde Cu alan sürülerde klinik semptomların daha hafif seyrettiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Gretchen ve Marcia 2019). Genç hayvanlar Cu eksikliğine daha duyarlıdır. Cu eksikliğinde ortaya çıkan gelişim bozukluğu ve canlı ağırlık kaybının oksidasyondaki aksaklıklar sonucu metabolik aktivitelerdeki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. (Purchase 2013). Cu antioksidan enzim üretimine katılması sebebi ile immün sistem için çok

önemlidir. Cu'nun katıldığı en önemli enzim sistemleri oksidazlardır. Cu; lisiloksidaz, süperoksitdismutaz, süperoksidaz, tirozinaz, seruloplazmin ve sitokromoksidaz gibi enzimlerin bir bileşenidir. Bu enzimlerin, kollajen ve elastinin yapısal bütünlüğü, süperoksit radikallerin detoksifikasyonu, pigmentasyon, demirin taşınması ve enerji metabolizması açısından önemli olduğu rapor edilmiştir (Gazioğlu ve Balıkcı 2017). Cu eksikliği ile kuzularda enzootik ataksi, kansızlık, bağışıklık sisteminin zayıflaması, gelişimde yavaşlama, kilo kaybı, ishal, kaba ve karmaşık yapağı yapısı ve kıllarda depigmentasyon gibi semptomlar görülmektedir. Cu yetersizliğinde tipik bulgu, karpal bölgede beliren şişkinliklerdir (Ting ve ark. 2020). Etiyolojisinde gebelik sürecinde vücutta yetersiz Cu bulunması olan enzootik ataksi, kongenital bir hastalıktır ve daha çok 2-4 aylık kuzular bu hastalıktan etkilenmektedir. Rakımı yüksek meralarda, mera ıslah çalışmalarının çok sık yapıldığı bölgelerde ve toprağında kireç bulunan meralarda otlayan hayvanlarda hastalık insidansı artmaktadır (Ayhan ve ark. 2012). Cu miktarının çok düşük olduğu durumlarda kuzular hasta olarak doğmalarına rağmen klinik bulgulara daha çok 1-2 aylık olduktan sonra rastlanmaktadır. Ataksi durumlarında kuzuların arka bacaklarında inkoordinasyon, parezis, köpek oturuşu, toprak yeme ve göğüs üzerine yatma gibi klinik bulgular görülmekte ve tedavi edilmediği takdirde 3-4 hafta içinde ölüm şekillenmektedir (Can J 1974). Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde Cu eksikliği sonucu kuzularda ortaya çıkan enzootik ataksi hastalığının teşhisinde kan Cu düzeyinin 0.5 ppm'den az olması kriter olarak bildirilmiştir (Tiftik ve Doğanay 1997).

Geviş getiren canlılar için dışarıdan alınması zorunlu elementlerden biri olan Co, rumen mikroorganizmaları tarafından kullanılarak kobalamin (Vit B12) sentezinde rol almaktadır (Bilal ve Bilal 2005). Kobalamin'in nükleusunu Co oluşturduğundan sentezlenmesi için gereklidir. B12 vitaminin yaklaşık %4'ünü Co oluşturmaktadır (Batmaz 2013). B12 vitamini ruminantlarda monogastrik hayvanların aksine, rumende mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Kobalamin sentezi için rasyonla birlikte yeterli düzeyde Co alınmalıdır (Aksoy 2016).

Co eksikliği olan kuzularda gelişimde yavaşlama, pika, zayıflık, anemi ve ikterus gibi semptomlar görülmektedir (Aksoy 2016; Şimşek 2016). Co yetersizliğinde beyaz karaciğer hastalığı oluşmakta ve semptomlar kuzularda daha şiddetli seyretmektedir (Batmaz 2013). Beyaz karaciğer hastalığı, koyunlarda verim miktarında büyük düşümlere sebep olan ve Co eksikliği ile ortaya çıkan, karaciğerde yağ birikimi ile ilişkili bir karaciğer hastalığıdır (Radostits 2008; Pugh ve Baird 2012; Erkiş ve Erdoğan 2016). Hastalık ekstansif yetiştiriciliği yapılan koyun ve keçilerde görülürken entansif yetiştiricilikte görülmemektedir. Ruminantların diyetlerinin yeterli düzeyde Co ihtiva etmesi gerekmektedir (Aksoy 2016). Diyetle Co miktarının 0.8 mg/kuru madde (KM)'den az olması yetersiz olarak kabul edilmektedir (Bilal ve Bilal 2005). Rasyonda Co miktarının düşük olmasının temel nedeninin toprakta Co elementinin az bulunmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Volkanik, drenajı kötü olan, erozyonlu ve kıraç yerlerde yetişen bitkiler Co bakımından fakirdir. Yapılan çalışmalarda koyun ve keçilerin sığırlara oranla hastalığa daha kolay yakalandığı ve genç hayvanların erişkinlere göre hastalığa daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Bilal ve Bilal 2005). Kuzuların günlük Co ihtiyacı koyunlara göre daha yüksek olduğundan en az 0.1 mg/kg/gün alınması gerekmektedir (Radostits 2008; Aitken 2009). Beyaz karaciğer hastalığı,

0.04-0.07 mg/kg düzeyinden daha az Co içeren rasyonlarla beslenen hayvanlarda görüldüğü saptanmıştır (Aytuğ ve ark. 1990). Rasyonla beraber yeterli Co alamayan hayvanların birkaç ay içerisinde karaciğerlerindeki kobalamin depoları tükenir ve hastalık belirtileri daha da şiddetlenir (Kennedy ve ark. 1997). MacPherson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, klinik semptom göstermeyen koyunlarda plazma kobalamin düzeyi 400-900 pg/ml arasında saptamışlardır. Aynı çalışmada, üç ayrı deneme grubuna ayırdıkları hayvanlarda Co eksikliğinde kan hemogloblin miktarı 6.4- 11.2 g/dl olarak belirlenmiştir (MacPherson ve ark. 1977). Kobalamin eksikliğinde anemi, anoreksia, kilo kaybı, verim miktarında azalma, lakrimasyon, ışığa duyarlılık ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi semptomlar görülmektedir (Vellema ve ark. 1997). Co eksikliğinin klinik semptomları daha çok süttan kesilmiş ve merada otlayan kuzularda ortaya çıkmaktadır (Yeşildere ve Deprem 2009). Kuzularda gelişme geriliği (kaslar zayıf, göğüs kafesi dar ve kafa yapısı büyük), anoreksia, pika, pubertasta gecikme, koyunlarda infertilite, düşük doğum oranı, düşük veya ölü doğum, gastrointestinal sistem bozuklukları, anemi, immun sistemin zayıflaması, süt ve yün veriminde azalma gibi klinik bulgulara rastlanmaktadır (Yeşildere ve Deprem 2009; Duncan ve Morrison 1981).

Bu çalışma, Siverek ve Muş bölgelerinde yetiştirilen kuzulardaki serum Se, Cu ve Co seviyelerinin araştırılması ve bu minerallerin eksikliğinde görülen hastalıkların önlenmesi için koruyucu tedbirlerin alınması amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Siverek ve Muş bölgelerinden 20-30 günlük akkaraman ırkı kuzulardan kan örnekleri alındı. Kan numuneleri vena jugularis'ten jelli kan alma tüplerine alındıktan sonra, 3000 rpm'de 5 dk santifüj edilerek elde edilen serumlar, -30°C'de analiz edilinceye kadar saklandı. Örnekler farklı işletmelerdeki 36 adet kuzudan elde edildi ve cinsiyete bağlı farklılıkları ortadan kaldırmak amacıyla dişi ve erkek sayıları eşit tutuldu. Örnek seçiminde kuzulara ve gebeliğin son 1 aylık sürecinden numuneler alınmaya kadar olan süreçte koyunlara herhangi bir mineral madde takviyesi yapılmadı. Numuneler merada otlayan koyunlardan doğan kuzulardan oluşturuldu. Serum Se, Cu ve Co düzeylerinin araştırılması amacıyla her bir bölgeden 9 dişi ve 9 erkek olmak üzere 18, toplamda ise 36 kuzu kullanılarak serum numuneleri elde edildi. Muş İl Tarım ve Orman müdürlüğünün 12.02.2021 tarih ve E.463074 sayılı yazısı ile çalışmanın etik kurul onay belgesine gerek olmadığı belirtilmiştir.

### Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi

Serumda mineral madde analizi için triton X-100 çözeltisi kullanılarak seyreltme işlemi yapıldı. Elde edilen serumlardaki Se, Cu ve Co elementlerinin analizleri atomik absorpsiyon spektrometresinde (AAS, Thermo Scientific, Model: İCE-3000 series) yapıldı (Morton ve Robert 1993).

### İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların, istatistiksel hesaplamaları SPSS 22 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar normal dağılım göstermeyenlerde Mann-Whitney "U" testi, normal dağılım gösterenlerde ise bağımsız t testi kullanılarak hesaplandı. P<0.05 istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## BULGULAR

Tablo 1'de serum Se ölçümleri için uygulanan ilişkisiz örneklem için t Testi sonuçları incelendiğinde, Siverek ilçesinde bulunan kuzuların serum Se değerleri istatistiksel olarak anlamlı olacak biçimde Muş ilinde bulunan kuzuların serum Se değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur (P<0.05).

**Tablo 1.** Serum Se değerlerinin kuzuların yaşadığı bölgeye göre farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla uygulanan ilişkisiz örneklem için t testi sonuçları.

**Table 1.** T test results for unrelated samples applied to examine whether the serum Se values differ according to the region where the lambs live.

	Grup	N*	Ortalama	Sd*	t	P*
Selenyum	Siverek	18	0.40	34	2.41	0.02
	Muş	18	0.36			

\*N bir gruptaki örnek sayısı, Sd serbestlik derecesi, P istatistiksel farklılık

Tablo 2'de yer alan Mann Whitney U Testi sonuçları incelendiğinde, kuzuların serum Cu değerleri yaşadıkları bölgelere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05).

**Tablo 2.** Serum Cu değerlerinin kuzuların yaşadığı bölgeye göre farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla uygulanan Mann Whitney U Testi sonuçları.

**Table 2.** Mann Whithney U Test results applied to examine whether the serum Cu values differ according to the region where the lambs live.

	Grup	N*	Sıra Ort.	Sıra toplamı	U	P*
Bakır	Siverek	18	21.22	382.00	113.00	0.13
	Muş	18	15.78	284.00		

\*N her bir gruptaki örnek sayısı, p istatistiksel farklılık

Tablo 3'te serum Co ölçümleri için uygulanan Mann Whitney U Testi sonuçları incelendiğinde, Muş ilinde bulunan kuzuların serum Co değerleri istatistiksel olarak anlamlı olacak biçimde Siverek ilinde bulunan kuzuların serum Co değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05).

**Tablo 3.** Serum Co değerlerinin kuzuların yaşadığı bölgeye göre farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla uygulanan Mann Whitney U Testi sonuçları.

**Table 3.** Mann Whithney U Test results applied to examine whether the serum Co values differ according to the region where the lambs live.

	Grup	N*	Sıra Ortalama	Sıra toplamı	U	P*
Kobalt	Siverek	18	11.64	209.50	38.50	0.00
	Muş	18	25.36	456.50		

\*N her bir gruptaki örnek sayısı, P istatistiksel farklılık

Tablo 4'te kuzuların serum Se ölçümlerine ait ortalamalara göre Siverek'teki ( $\bar{X}_S = 0.3972$ ) kuzuların Se ölçümüne ait ortalama değeri Muş'taki ( $\bar{X}_M = 0.3663$ ) kuzulara göre

daha yüksektir. Tablo 4 incelendiğinde benzer biçimde kuzuların minimum ve maximum Se değerlerinin de kuzuların buldukları bölgeye göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Grupların Se ölçümlerinin dağılımlarına ait basıklık ve çarpıklık değerleri ele alındığında, bu değerlerin standart hatalarına oranlarının hem Siverek hem de Muş'ta bulunan kuzular için -1.96 ile +1.96 arasında olduğu, başka bir ifadeyle normal dağılım gösterdiği söylenebilir.

Cu ölçümlerine ait Tablo 4'te yer alan betimsel istatistikler ele alındığında, ortalamaların gruplara göre değişim gösterdiği görülmektedir. Ortalamalara göre Siverek'teki ( $\bar{X}_S = 0.6707$ ) kuzuların Cu ölçümüne ait ortalama değeri Muş'taki ( $\bar{X}_M = 0.6214$ ) kuzulara göre daha yüksektir. Tablo 4 incelendiğinde benzer biçimde kuzuların, minimum ve maximum Cu değerlerinin de kuzuların buldukları bölgeye göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Grupların Cu ölçümlerinin dağılımlarına ait basıklık ve çarpıklık değerleri ele alındığında, bu değerlerin standart hatalarına oranlarının Siverek'te

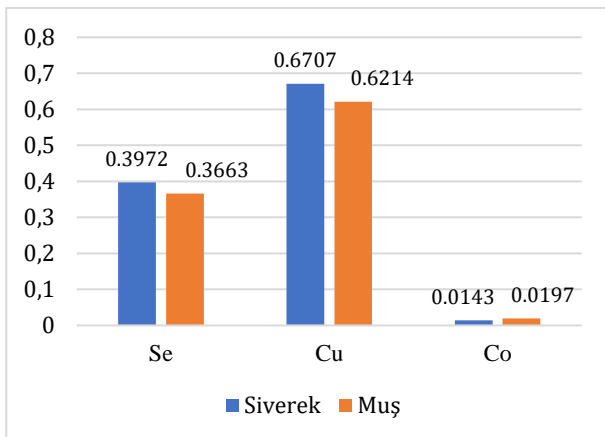
bulunan kuzular için -1.96 ile +1.96 arasında olduğu yani normal dağılım gösterdiği ancak Muş ilindeki kuzular için -1.96 ile +1.96 aralığının dışında olduğu yani normal dağılım göstermediği söylenebilir.

Tablo 4'te kuzuların Co ölçümlerine ait betimsel istatistikleri ele alındığında, ortalamaların gruplara göre değişim gösterdiği görülmektedir. Ortalamalara göre Muş'taki ( $\bar{X}_M = 0.0197$ ) kuzuların Co ölçümüne ait ortalama değeri Siverek'teki ( $\bar{X}_S = 0.0143$ ) kuzulara göre daha yüksektir. Tablo 4 incelendiğinde benzer biçimde kuzuların minimum ve maximum Co değerlerinin de kuzuların buldukları bölgeye göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Grupların Co ölçümlerinin dağılımlarına ait basıklık ve çarpıklık değerleri ele alındığında, bu değerlerin standart hatalarına oranlarının Muş'ta bulunan kuzular için -1.96 ile +1.96 arasında olduğu yani normal dağılım gösterdiği ancak Siverek'teki kuzular için -1.96 ile +1.96 aralığının dışında olduğu yani normal dağılım göstermediği söylenebilir.

**Tablo 4.** Araştırma kapsamında incelenen kuzuların serum Se, Cu ve Co değerlerinin bölgelere ait betimsel istatistikleri.

**Table 4.** Descriptive statistics of the serum Se, Cu and Co values of the lambs examined within the scope of the study.

Değişken	Grup	N	Ortalama		Std. Sap.	Min.	Max.	Çarpıklık		Basıklık	
			İst.	Std. Hata				İst.	İst.	İst.	Std. Hata
Se	Siverek	18	0.3972	0.0095	0.0403	0.3380	0.4710	0.1544	0.5363	1.2541	1.0378
	Muş	18	0.3663	0.0086	0.0365	0.3010	0.4230	0.0053	0.5363	0.7170	1.0378
Cu	Siverek	18	0.6707	0.0611	0.2592	0.2830	1.2650	0.8632	0.5363	0.7563	1.0378
	Muş	18	0.6214	0.0751	0.3188	0.4120	1.8490	3.7256	0.5363	14.8685	1.0378
Co	Siverek	18	0.0143	0.0025	0.0105	0.0020	0.0490	2.0587	0.5363	7.0017	1.0378
	Muş	18	0.0197	0.0005	0.0021	0.0150	0.0230	0.7726	0.5363	0.5804	1.0378



**Şekil 1.** Araştırma kapsamında incelenen kuzuların serum Se, Cu ve Co miktarlarının Siverek ve Muş bölgelerindeki ortalama değerleri.

**Figure 1.** Average values of serum Se, Cu and Co amounts in Siverek and Muş regions of lambs examined within the scope of the study.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, Siverek ve Muş bölgelerindeki 20-30 günlük Akkaraman ırkı kuzuların serum Se, Cu ve Co değerlerinin, araştırılması ve bu minerallerin yetersizliğinde ortaya çıkabilecek hastalıkların önlenmesi amacıyla yapılmıştır. Örnek seçiminde kuzulara ve gebeliğin son 1 aylık sürecinden numuneler alınmaya kadar olan süreçte koyunlara herhangi bir mineral madde takviyesi yapılmamıştır.

Siverek'teki kuzuların Muş'taki kuzulardan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek serum Se miktarına sahip olduğu ancak, her iki bölgede serum Se seviyelerinin referans değerlerden (0.15-0.35 ppm) daha yüksek olduğu görülmektedir. Kuzulara ve annelerine herhangi bir selenyum preparatının uygulanmamış olmasına rağmen serum Se değerinin yüksek bulunmuş olması her iki bölgedeki meraların Se içeriği yüksek olan bitkiler içermesinden kaynaklanıyor olabilir. Qvernes ve arkadaşları (1985) kuzularda serum Se konsantrasyonunun 0.15-0.35 ppm arasında olması gerektiğini, 0.1 ppm düzeyinin altına düştüğü durumlarda ise beyaz kas hastalığının şekillendiğini bildirmiştir.

Hayvan beslenmede büyük öneme sahip olan Cu'nun, Türkiye'de yetiştirilen koyunlarındaki miktarı çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir (Çamaş ve ark. 1999). Kuzularda serum Cu seviyesinin 0.80-1.20 ppm değerleri arasında olması gerektiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Faye ve ark. 1990). Kuzularda serum Cu seviyesinin 0.50 ppm seviyesinin altına düşmesi durumunda enzootik ataksi hastalığının ortaya çıktığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Çamaş ve ark. 1999). Yaptığımız çalışmada, serum Cu analiz sonuçları değerlendirildiğinde, Siverek ve Muş bölgeleri arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ). Ancak, hem Siverek (0.6707) hem de Muş (0.6214) bölgelerindeki serum örneklerinde Cu seviyesinin normal değerlerden (0.80-1.20 ppm) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Bu durum subklinik olarak seyreden enzootik ataksi hastalığının olduğunu göstermektedir. Ayrıca Tablo 4 incelendiğinde hem Siverek hem de Muş'tan alınan örneklerde kritik düzeyin (0.50ppm) altında serum Cu seviyesine sahip kuzular tespit edilmiştir. Bu durum, topraktaki Cu miktarının Siverek ve Muş bölgelerinde düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Şekil 1'e göre serum Co analiz sonuçları değerlendirildiğinde, hem Siverek (0.0143) hem de Muş'taki (0.0197) kuzuların serum Co seviyeleri referans değerler (0.017-0.051 ppm) arasında olacak şekilde tespit edilmiştir. Co eksikliğinde ortaya çıkan beyaz karaciğer hastalığında kuzuların serum Co değerlerinin 0.017 ppm'den düşük olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Batmaz 2013). Tablo 3 incelendiği zaman serum Co seviyesinin Siverek'teki kuzularda Muş'taki kuzulara oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olduğu görülmektedir ( $P<0.05$ ). Bu durum volkanik bölgelerde toprağın Co seviyesinin düşük olmasıyla açıklanabilir (Aksoy 2016).

Sonuç olarak, Siverek ve Muş bölgelerinde yetiştirilen kuzularda serum Se seviyeleri normal değerlerden yüksek bulunurken, Cu seviyesi referans değerlerden düşük olarak tespit edilmiştir. Cu yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkan enzootik ataksi hastalığının önlenmesi için rasyonla veya ilaç desteğiyle Cu takviyesinin yapılması önerilebilir. Serum Co değerleri ise her iki bölgede de referans değerler arasında olacak şekilde belirlenmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: VK, MI  
Tasarım: VK, MI  
Denetleme/Danışmanlık: VK, MI  
Veri Toplama ve/veya İşleme: VK, MI  
Analiz ve/veya Yorum: VK, MI  
Kaynak Taraması: VK, MI  
Makalenin Yazımı: VK, MI  
Eleştirel İnceleme: VK, MI

## KAYNAKLAR

Aaseth J, Alexander J, Björklund G et al. (2016). Treatment strategies in Alzheimer's disease: A review with focus on selenium supplementation. *Biometals*, (29), 827-839.

Ahmad MS, Yasser MM, Sholkamy EN, Ali AM, Mehanni MM (2015). Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess\_amA-1. *Int. J. Nanomed*, (10) 3389-3401.

Aitken ID (2009). Diseases of Sheep. 4th Edition, Blackwell UK.

Aksoy G (2016). İz Element ve Vitamin Teminindeki Bozukluklar. İn: Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun Keçi). Gül Y. (Ed), 513-534, 4. Baskı. Medipres Yayıncılık, Malatya.

Al Busadah KA (2003). Trace Elements (status) in camel, cattle and sheep in Saudi Arabia. *Pak Jour of Bio Sci*, 6 (21), 1856-1859.

Ayhan O, Alcigir G, Dincel AS, Yonguc AD, Akcora A (2012). Histopathological and biochemical findings of congenital copper deficiency: are these similar to those of caprine arthritis-encephalitis? *J Vet Sci*, 13(1), 107-9.

Aytuğ CN, Yalçın BC, Alaçam E, et al. (1990). Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Teknografik Matbaası, İstanbul.

Bağdaş B, Yıldız AÖ (2004). Broyler rasyonlarına ilave organik selenyum ve vitamin E'nin performans karkas karakterleri ve bazı dokularda selenyum konsantrasyonuna etkileri. *SÜ Zir Fak Derg*, 18 (34), 94-100.

Batmaz H (2013). Koyun ve Keçilerin İç Hastalıkları Semptomdan Taniya, Tamdan Sağaltıma. 1. Baskı Alemdar Ofset, İstanbul.

Bilal T, Bilal T (2005). Koyun-Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.

Bildik A, Yur FG, Belge F, Değer Y, Dede S (2007). Hamdani koyunlarında bazı kan parametrelerinin araştırılması. *Vet Bil Derg*, 13(1), 17-21.

Bozenna H, Martha K, Sylvie S et al. (2017). A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species A Critical Review. *Int J Mol, Sci*, 18, 2209, 1-47.

Caglar D, Jung HH, James FC (2018). Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Compr Physiol*, 8(4), 1433-1461.

Can J (1974). Swayback (enzootic ataxia) in Alberta lambs G A Chalmers. *Comp Med, Apr* 38(2), 111-7.

Cihalova K, Chudobova D, Michalek P et al. (2015). Staphylococcus aureus and MRSA Growth and Biofilm Formation after Treatment with Antibiotics and SeNPs. *Int J Mol Sci*, 16, 24656-24672.

Combs GFJ, Gray WP (1998). Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacol Ther*, 79, 179-192.

Çamaş H, Bildik A, Gülser F (1999). Investigation on some trace elements (Cu, Mo, Zn, Co, Mn) and sulphate in soil, grass and sheep's blood. *Van Vet J*, 10, 87-91.

Çimtay İ, Ölçücü A (2000). Elazığ yöresinde klinik olarak ağırlıklı görülen sığırlarda kan plazması ve kıl bakır değerleri üzerinde araştırmalar. *Turk J vet Anim Sci*, 24, 267-273.

Dabak M, Karataş F, Gül Y, Kızıl Ö (2002). Besi sığırlarında Selenyum ve E vitamini yetersizliğinin araştırılması. *Turk J Anim Sci*, 26, 741-746.

Duncan WRH, Morrison ER, Garton GA (1981). Effects of cobalt deficiency in pregnant and post parturient ewes and their lambs. *British J Nut*, 46, 337-344.

Eren V (2009). Rasyona eklenen organik iz minarelerin gebe koyun ve yeni doğan kuzularında bazı verim özelliklerine etkisi işle birikim ve atılma düzeylerinin belirlenmesi. Doktora tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri enstitüsü, Aydın.

Erika S, János K, István K, János O, Csaba S (2020). Newly Grown Wool Mineral Content Response to Dietary Supplementation in Sheep. *Animals (Basel)*, 11-10(8), 1390.

Erkılıç EE, Erdoğan HM (2016). Beyaz karaciğer hastalığı. Türkiye Klinikleri *J Vet Sci Med-Special Topics*, 2, 70-72.

Faye B, Kamil M, Labonne M (1990). Teneur en oligo-elements dans les fourrages et le plasma des ruminants domestiques en republique de djibouti. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 43, 365-373.

Gazioğlu A, Balıkcı E (2017). Geçiş dönemindeki ineklerde serum bakır, çinko, mangan ve kobalt düzeyleri. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 31(2), 101 - 104.

Gretchen MH, Marcia CS (2019). Copper and Zinc Nutritional Issues for Agricultural Animal Production. *Biol Trace Elem Res*, 188 (1),148-159.

Gustavo RGA, Bartira G, Paulo AL, Isabela MB, Dirce M (2018). Dietary Selenium Intake and Subclinical Hypothyroidism: A Cross-Sectional Analysis of the ELSA-Brasil Study. *Marchioni Nutrients*, Jun 10(6), 693.

Kennedy S, McConnell S, Anderson H, et al. (1997). Histopathologic and ultrastructural alterations of white liver disease in sheep experimentally depleted of cobalt. *Vet Path*, 34, 575-584.

Kurt D, Denli O, Kanay Z, Güzel C, Ceylan K (2001). Diyarbakır Bölgesi Akkaraman Koyunların Kan Serumun Cu, Zn, Se ve Yünde Cu, Zn Düzeylerinin Araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 431-436.

MacPherson A, Moon FE, Voss RC (1977). The influence of cobalt-deficient diets on housed sheep. *Vet Rec*, 101-231.

Malkin R, Malmstrom SG (1970). The state and [unction of copper in BiolOgical systems. *Adv in Enzym*, 33, 177-244.

Ming S, Miriam BV, Craig JM (2018). Copper-Fructose Interactions: A Novel Mechanism in the Pathogenesis of NAFLD. *Nutr*, 10(11), 1815.

- Morton S, Robert DJ (1993).** Unicam AAS Methods, Manual Issue 2 (05/93) Universty of Bristol, UK Placer. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16, 359-364.
- Pascual A, Aranda A (2013).** Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys*, 1830, 3908-3916.
- Peng F, Guo X, Li Z et al. (2016).** Antimutagenic effects of selenium-enriched polysaccharides from *pyracantha fortuneana* through suppression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. *Molecules*, 21, 1731.
- Pugh DG, Baird AN (2012).** Sheep and Goat Medicine. 2nd Edition, Elsevier, Missouri.
- Purchase R (2013).** The link between copper and Wilson's disease. *Sci Prog*, 96, 213-23.
- Qvernes G, Maksnes K, Frasolie A, Gunnar N, Johanes F (1985).** The effect of different levels of selenium in mineral mixtures and salt licks on selenium status in sheep. *Acta Vet Scand*, 26, 405-416.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2008).** Veterinary Medicine. Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 10th St Louis (Ed), Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Rayman MP (2000).** The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356, 233-241.
- Shehata E (2019).** Changes in Arsenic and Copper Bioavailability and Oxytetracycline Degradation during the Composting Process. *Molecules*, 24(23), 4240.
- Şimşek A (2016).** Mangan ve kobalt yetmezliği. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Med-Special Topics*, 2, 20-24.
- Tiftik AM, Doğanay S (1997).** İzmir bölgesi koyunlarında kan serumu bakır (Cu), demir (Fe), total demir bağlama kapasitesi (tdbk) ve çinko (Zn) düzeylerinin araştırılması. *Vet. Bil.derg.*, 13(1), 147-156.
- Ting W, Manling S, Xiaoyun S (2020).** Seasonal Dynamics of Copper Deficiency in Wumeng Semi-Fine Wool Sheep. *Biol Trace Elem Res*, 197(2), 487-494.
- Underwood EJ, Suttle NF(1999).** The Mineral Nutrition of Livestock, 3rd (ed), 294-482, CABI Publishing, UK.
- Vellema P, Moll L, Barkema HW, Schukken YH (1997).** Effect of cobalt supplementation on serum vitamin B levels, weight gain and survival rate in lambs grazing cobalt-deficient pastures. *Veterinary Quarterly*, 19, 1-5.
- Yalçınkaya İ, Güngör T, Çınar M, Saçaklı P (2010).** Broyler rasyonlarında organik selenyum ve vitamin E kullanımının performans, iç organ ağırlıkları ve kan parametreleri üzerine etkisi. *Kafkas üniv. Vet fak Derg*, 16(1), 27- 32.
- Yeşildere T, Deprem O (2009).** Scott PR. Sheep Medicine. 1. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul.





## Morphological Determination of the Effect of Nitric Oxide on Egg Embryo Development

Tuba BÜLBÜL<sup>1</sup>  Mustafa TATAR<sup>2</sup>  Mehmet Aydın AKALAN<sup>3</sup>  Hülya ATİK<sup>4</sup> 

Murat Sırrı AKOSMAN<sup>3</sup>  Aysun Çevik DEMİRKAN<sup>3</sup>  İsmail TÜRKMEÑOĞLU<sup>3</sup>  Vural ÖZDEMİR<sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Milas Veterinary Medicine, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

<sup>2</sup>Afyonkarahisar Directorate of Provincial Agriculture and Forestry

<sup>3</sup>Department of Anatomi, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>4</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

Received: 28.09.2020

Accepted: 16.12.2020

### ABSTRACT

This study was carried out to determine the effect of sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide (NO) exogenous donor, and NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO inhibitor, on the development of chicken embryos by injected into the egg. A total of 210 hatching fertilized chicken eggs used into control, Sham control (SC), serum physiological (SP) and treatment groups containing 30 eggs. The air space of the remaining eggs was pierced at the beginning of the incubation, whereas the eggs in the control group were not subjected to any application (negative control). The SC group of the drilled eggs was immediately closed with paraffin. After the SP group was called a positive control, 50 and 200 mg/kg SNP respectively and L-NAME solutions at the same levels were injected into the hole opened to the air space into the experimental groups consisting of the remaining eggs. The eggs were opened on some days 7th and 14th of the embryonic period and the following parameters of each group were determined: Relative embryo weights, weights and lengths of the embryos (on days 7th and 14th), hatching weight, hatching length, hatching rate and embryonal deaths (on day 21st). The results showed that the relative embryo weight and embryo length on the days 7th and 14th of the hatching and the hatching weight on the day 21st of the hatching were not affected by injection of SNP and L-NAME ( $P>0.05$ ). Hatching rate on the day 21st was highest in the L-NAME50 group, whereas this rate was lowest in the SNP200 group ( $P<0.05$ ). Hatching length increased in the L-NAME200 group ( $P<0.05$ ). It was observed that NO was functional in embryonic development of poultry, and the increase in its metabolism decreased in the hatching rate increasing embryonal death.

**Keywords:** Chicken embryo, Embryotoxicity, L-NAME, SNP

### ÖZ

## Nitrik Oksidin Yumurta Embriyosu Gelişimi Üzerine Etkisinin Morfolojik Olarak Belirlenmesi

Bu araştırma, nitrik oksidin (NO'nun) ekzojen donörü sodyum nitroprussid (SNP) ve NO inhibitörü N-nitro-L-Arjinin metil esterin (L-NAME'in) yumurtaya enjeksiyon yapılarak kanatlı embriyonal gelişimi üzerinde oluşturduğu etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Araştırmada toplam 210 adet kuluçkalık dömlü tavuk yumurtası her biri 30 yumurtadan oluşan kontrol, Sham kontrol (SK), serum fizyolojik (SF) ve deneme gruplarında kullanıldı. Kontrol grubundaki yumurtalara hiçbir uygulama yapılmazken (negatif kontrol), geri kalan yumurtaların kuluçka başlangıcında hava kamarası delindi. Delinen yumurtalardan SK grubu hemen parafinle kapatıldı. SF grubu pozitif kontrol olarak adlandırıldıktan sonra geriye kalan yumurtaların oluşturduğu deneme gruplarına sırasıyla 50 ve 200 mg/kg SNP ve aynı düzeylerde L-NAME solüsyonları hava kamarasına açılan deliğe enjekte edildi. Embriyonik dönemin 7 ve 14. günlerinde yumurtalar açılarak gruplarda rölatif embriyo ağırlığı ve embriyo uzunluğu (7. ve 14. günlerde) ile çıkım ağırlığı, çıkım uzunluğu, çıkım oranı ve embriyonal ölümler (21. günde) belirlendi. Kuluçkanın 7. ve 14. günlerindeki rölatif embriyo ağırlığı ve embriyo uzunluğu değerleri ile 21. güne ait çıkım ağırlığının SNP ve L-NAME enjeksiyonundan etkilenmediği görüldü ( $P>0.05$ ). Araştırmada 21. gününe ait çıkım oranı L-NAME50 grubunda en yüksek iken, SNP200 grubunda en düşük olarak belirlendi ( $P<0.05$ ). Çıkım uzunluğunun L-NAME200 grubunda arttığı tespit edildi ( $P<0.05$ ). Sonuç olarak, NO'nun kanatlılarda embriyonal gelişimde fonksiyonel olmakla birlikte metabolizmasındaki artışın embriyonal ölümü artırarak kuluçka çıkım oranını azalttığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Embriyotoksosite, L-NAME, SNP, Tavuk embriyosu



## GİRİŞ

Nitrik oksit (NO), düşük molekül ağırlığına sahip, hidrofobik, gazsal yapılı ve hücre içi ile hücreler arası mesaj iletiminde rol oynayan serbest radikal bir moleküldür (Knowles ve Moncada 1994). Bu molekül memeli ve kanatlı hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen enzim aracılığı ile L-arjinin aminoasidinden sentezlenmektedir (Knowles ve Moncada 1994, Choi ve ark. 1996). Nitrik oksitin gerek memelerde gerekse kanatlılarda tüm sistemler üzerine önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda NO donörleri (Sodyum Nitro Prussid, SNP; arjinin) ve inhibitörleri (N-nitro-L-arjinin metil ester, L-NAME; N-nitro-L-arjinin, LNNA, aminoguanidin, flunixin meglumin) kullanılarak NO'nun canlılar üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Curran ve ark. 1990, Moncada ve Higgs 1993, Bulbul ve ark. 2015a). Nitrik oksit, beyinde ve periferel sistemde folliküler gelişimin düzenlenmesi, ovulasyon mekanizması ve yumurta veriminde önemli rol oynayan maddelerden biridir (Manwar ve ark. 2006). Ovaryumda NOS enziminin varlığı kanatlılarda gösterilirken, lokal olarak ovaryumdan düşük düzeyde salınan NO'nun apoptozisi engelleyerek folliküler gelişimi uyardığı ifade edilmektedir (Kim ve ark. 2001). Nitrik oksitin primordial folliküllerden primer follikül, primerden ise sekonder folliküle geçişte görev aldığı belirtilmektedir (Bulbul ve ark. 2015b). Bununla birlikte aynı araştırmada SNP'nin 200 mg/kg düzeyinin ovaryumdaki primer ve premordiyal folliküllerin sayısını yükselttiği, dolayısıyla primer ve premordiyal folliküllerde dejenerasyonu engellediği gösterilmiştir.

Kanatlı embriyoları, özellikle tavuk embriyosu embriyonal çalışmalarda kullanılan bazı ilaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, pestisitler, ağır metaller, mikotoksinler ve diğer kimyasal maddelerin embriyotoksik, mutajenik, teratojenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yapılan deneysel testlerde kullanımı en çok tercih edilen materyallerdendir (Heinrich-Hirsch ve Neubert 1991). NO'nun memelilerde embriyo tarafından da üretildiği ve bu şekilde oluşan NO'nun endometriyumda lokal damar genişlemesi ile hormonlar veya sitokinlerin düzenlenmesinde görev aldığı belirtilmektedir. Bununla birlikte NO'nun kullanım düzeyine bağlı olarak embriyonik kayıplara neden olabileceği ifade edilmektedir (Blashkiv ve ark. 2001, Chen ve ark. 2001, Lepiller ve ark. 2007). Buna karşın iNOS inhibitörü olan flunixin megluminin (Öznurlu ve Öznurlu 2016) civciv embriyosu üzerine etkisini bildiren araştırma dışında NO'nun ekzojen donörü olan SNP ve inhibitörü olan L-NAME'in kanatlı embriyosu üzerine etkisi değerlendirilmemiştir. Nitrik oksit stimülasyonu ya da inhibisyonunun tavuk embriyosu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Yapılan bu araştırmada SNP ve L-NAME'in kanatlı embriyonal gelişimi üzerine olası etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

### Yumurtalar, Araştırma Grupları ve Enjeksiyonlar ile Kuluçka İşlemleri

Araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu'nun (AKÜHADYEK-103-18) onayını takiben, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan kuluçka makinasında (Cimuka CT120SH, Türkiye) yürütüldü.

Araştırmada kanatlı anaçlardan elde edilen beyaz yumurtacı ırkı damızlıklara ait toplam 210 adet kuluçkalık dömlü tavuk yumurtası kullanıldı. Işıklı kutuda muayene

edilip normal poroziteye sahip olanlar araştırmaya dahil edildi. Yumurtalar birer birer tartılarak kuluçka başlangıç ağırlıkları belirlendi. Daha sonra her bir yumurta kapalı kabinde dezenfeksiyon amacıyla 21 g potasyum permanganat 42 mL formaldehit/m<sup>3</sup> karışımıyla elde edilen buhara maruz bırakıldı.

Araştırmada 30 yumurta hiçbir uygulamanın yapılmadığı negatif kontrol grubu olarak ayrılırken, geri kalan 180 yumurta kuluçka başlangıcında hava kamarası özel yumurta delicisi ile delindi. Delinen yumurtalardan 30'u Sham Kontrol grubu (SK, delindikten sonra hemen parafinle kapatılacak olan grup), diğer 30'u serum fizyolojik grubu (SF, pozitif kontrol) olarak adlandırıldıktan sonra geriye kalan yumurtaların oluşturduğu deney gruplarına iki farklı dozda SNP (Sigma 71778) ve L-NAME (Sigma N5751) solüsyonları hava kamarasına açılan deliğe enjekte edildi (Prelusky ve ark. 1987, Celik ve ark. 2000). Bu işlem için yumurtanın küt ucunun dezenfeksiyonunu sonrası steril uçlu özel mikropipet (Sealpette, Jencons) kullanıldı. SNP ve L-NAME daha önce hayvanlarda (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) sırasıyla 50-200 ve 50-200 mg/kg dozunda uygulandı (Bülbül ve ark. 2015a, b). Araştırmada ise SNP ve L-NAME gruplarında uygulama hacmi Serum Fizyolojik (SF) kullanılarak 0.025 ml şeklinde ayarlanarak yapıldı. Enjeksiyonların yapılmak üzere delindiği tüm hava kamaraları, sıvı parafinle kapatıldı. Daha sonra yumurtalar, önceden dezenfekte edilen dezenfeksiyonu yapılan 37.5°C sıcaklık, % 65 nispi nem ve düzenli havalandırma koşullarında oluşturulduğu kuluçka makinasına uygun şekilde yerleştirildi. Burada her bir gruba ait yumurtaların her bir katta eşit sayıda olacak şekilde homojen yerleştirilmesine dikkat edildi. Ayrıca günde 12 kez (her iki saatte bir) yumurtalar burada otomatik olarak 180°lik/45°lik açıyla öne ve arkaya doğru döndürüldü. Böylece araştırmadaki tüm yumurtaların standart koşullar altında inkube edilmesi sağlandı.

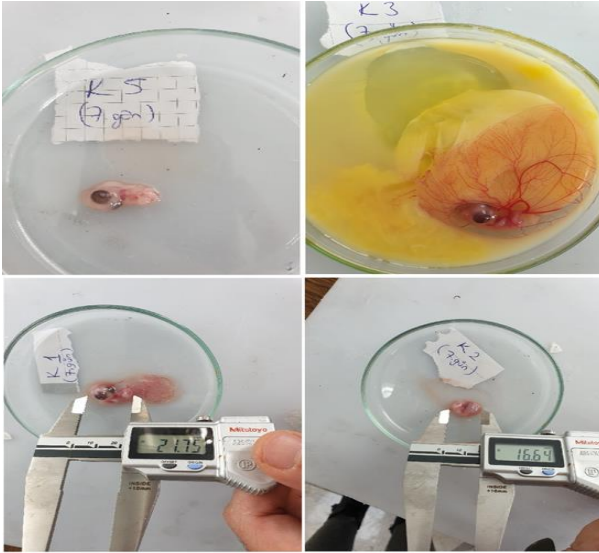
### Embriyo Ağırlıkları ve Uzunluklarının Belirlenmesi

Kuluçkanın 7. ve 14. günlerinde gruplardan rastgele alınan 10 yumurta birer birer hassas teraziyle tartılıp ağırlıkları belirlendi. Daha sonra bu yumurtalar yine aynı günlerde açılıp elde edilen embriyolar da aynı şekilde tartılarak embriyo ağırlıkları saptandı. Embriyo tepe-kıç uzunluğu (EU) dijital bir kumpasla (Mitutoyo Digimatic Caliper, CDN- P20PMX, Japan) ölçüldü (Şekil 1). Bu değerlerden yararlanılarak rölatif embriyo ağırlıkları (REA) aşağıdaki formüle göre bulundu:

$$\text{Rölatif embriyo ağırlığı (\%)} = \left( \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \right) \times 100$$

### Çıkım Oranı, Ağırlıkları ve Uzunluklarının Belirlenmesi

Kuluçkanın 21. gününde gruplardan rastgele alınan 10 yumurta birer birer hassas teraziyle tartılıp ağırlıkları belirlendi. Daha sonra açılan bu yumurtaların embriyoları tartılarak çıkım ağırlıkları (ÇA) bulundu. Çıkım uzunluğu (ÇU) için embriyoların tepe ile kıç arasındaki mesafe dijital bir kumpasla (Mitutoyo Digimatic Caliper, CDN- P20PMX, Japan) ölçüldü (Şekil 1). Kuluçkanın son gününde gruplarda çıkım oranının (ÇO) belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanıldı (Aksoy 1994). Çıkım Oranı (%) = (Çıkan civciv sayısı / Makineye konulan dömlü yumurta sayısı) x 100



**Şekil 1.** Kontrol grubunda 7. güne ait görüntüler.

**Figure 1.** Images of the 7th day in the control group.

### Malformasyonlar ve Gelişme Geriliklerinin Belirlenmesi

Kuluçkanın 21. gününe ait embriyoların gelişim dönemi yumurtalar tek tek kırılarak Hamburger ve Hamilton (1951) Skalasına göre değerlendirildi. Buna göre embriyolarda oluşan makroskobik anomaliler, gelişme geriliği, ölüm oranları değerlendirildi.

### İstatistiksel Analizler

Embriyonik mortaliteler gruplardan elde edilen fertil yumurta sayılarına göre hesaplandı. Embriyonik mortalite verileri ki-kare testiyle değerlendirilirken, rölatif embriyo ve civciv ağırlığı ile tepe-kıç uzunluklarının değerlendirilmesinde One-Way Anova ve Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel testler, SPSS (9.0.0 versiyonu) paket programı göre yapıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi.

### BULGULAR

Araştırmada başlangıç (0 gün), 7., 14. ve 21. güne (yumurtadan çıkıma) ait ölçümler sırasıyla Tablo 1 ve 2'de gösterilmektedir. Araştırmada gruplarda yumurta başlangıç ağırlıkları ile birlikte 7. ve 14. günlerdeki rölatif embriyo ağırlığı ve embriyo uzunluğu değerleri açısından herhangi bir fark saptanmadı ( $P > 0.05$ ; Tablo 1, Şekil 1). Araştırmanın 21.gününe ait çıkım parametreleri incelendiğinde çıkım ağırlığı bakımından kontrol ve deneme grupları arasında farklılık görülmemesine ( $P > 0.05$ ) rağmen, çıkım oranı ve çıkım uzunluğunun deneme grupları arasında değiştiği tespit edildi ( $P < 0.05$ ; Tablo 2). En yüksek çıkım oranı % 90 ile kontrol grubunda gözlenirken; bunu sırasıyla SK (% 83.3), SF (% 76.7) ve deneme grupları izledi. Çıkım oranı deneme gruplarından L-NAME50 grubunda en yüksek (% 70) iken, SNP200 grubunda en düşük (% 40) olarak belirlendi. Çıkım uzunlukları incelendiğinde ise en farklı ve en yüksek değer L-NAME200 grubunda (91.66 mm) görülürken; kontrol (83.84 mm), SK (82.73 mm), SF (84.33 mm) grupları ile deneme gruplarının çıkım uzunlukları değerlerinin birbirine benzer olduğu tespit edildi. Araştırmanın 21.günüdeki embriyolojik gelişim incelendiğinde kontrol grubundaki gelişimin Hamburger-Hamilton (1951) skalasına uygun olduğu gözlemlendi. Deneme gruplarında ise bu skalaya göre embriyolarda gelişim geriliği saptanırken;

en fazla gelişim geriliği ve ölüm oranı SNP200 grubunda tespit edildi.

**Tablo 1.** Gruplara ait yumurta başlangıç ağırlığı (YBA) ile 7. ve 14. günlerdeki rölatif embriyo ağırlığı (REA) ve embriyo uzunluğu (EU) ortalamaları.

**Table 1.** The initial weight of the egg groups with mean relative embryo weight (REA) and embryo length (EU) on days 7 and 14.

	YBA, g	REA (7. gün), %	EU (7.gün), cm	REA (14. gün), %	EU (14.gün), cm
Kontrol	51.63±0.81	0.76±0.07	24.11±0.99	10.34±0.77	48.90±2.75
SK	50.46±0.60	0.90±0.04	25.67±0.29	11.55±0.54	49.06±2.44
SF	51.13±0.59	0.87±0.03	25.42±0.19	11.94±0.49	52.51±3.68
SNP50	50.93±0.63	0.81±0.05	25.38±0.70	11.41±0.44	50.87±1.51
SNP200	51.73±0.63	0.78±0.04	25.02±0.74	11.63±0.41	53.04±4.06
L-NAME50	52.23±0.72	0.83±0.10	23.61±0.44	10.74±0.49	51.72±3.45
L-NAME200	51.63±0.59	0.83±0.03	24.33±0.55	10.35±0.32	53.10±2.50
P	0.580	0.660	0.324	0.216	0.888

SK: Sham Kontrol, SF: Serum Fizyolojik, SNP: Sodyum Nitro Prussid, L-NAME: N-nitro-L-arjinin metil ester. Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P > 0.05$ ).

**Tablo 2.** Gruplara ait çıkım oranı (ÇO), çıkım ağırlığı (ÇA) ve çıkım uzunluğu (ÇU) ortalamaları.

**Table 2.** Hatching rate (HR), hatching weight (HW) and hatching length (HL) average in the groups.

	ÇO, %	ÇA, g	ÇU, mm
Kontrol	90	34.31±1.30	83.84±0.30 <sup>a</sup>
SK	83.3	34.19±1.15	82.73±0.52 <sup>a</sup>
SF	76.7	34.27±0.65	84.33±0.93 <sup>a</sup>
SNP50	53.3	35.24±0.93	84.45±0.96 <sup>a</sup>
SNP200	40	37.14±0.98	84.40±0.88 <sup>a</sup>
L-NAME50	70	34.44±0.95	84.95±1.39 <sup>a</sup>
L-NAME200	60	38.43±0.90	91.66±0.82 <sup>b</sup>
P	0.000	0.053	0.000

SK: Sham Kontrol, SF: Serum Fizyolojik, SNP: Sodyum Nitro Prussid, L-NAME: N-nitro-L-arjinin metil ester. <sup>a,b</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası fark önemlidir ( $P < 0.001$ )

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanatlı embriyoları özellikle tavuk embriyosu, kimyasal maddelerin embriyotoksik etkilerinin de belirlenmesinde yapılan testlerde tercih edilen materyallerdendir (Ubeda ve ark. 1994). Bu amaçla geliştirilen testlerden biri Tavuk Embriyotoksikite Belirleme Testi'dir (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST'dir). Bu testin birinci aşamasından elde edilen sonuçların morfolojik durumlar yönünden memelilerle uyumlu özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Jelinek ve ark. 1985, Jelinek ve Marhan 1994). Özellikle erken dönem civciv embriyo modelinin, memelilerdeki embriyonik gelişimin ilk ayına benzer olduğu belirtilmektedir (Unlu 2002). Bununla birlikte prenatal etkinin değerlendirilmesi açısından kullanılan CHEST; embriyosunun gelişim dönemlerinin çok iyi belirlenebilmesi, çok sayıda embriyonun kullanılabilmesi, canlı bir organizmaya verilebilecek verebileceği ağrı ve acıyı en aza indirmesi gibi avantajlara sahiptir (Jelinek ve ark. 1985). Bu bağlamda mevcut çalışmada NO'nun embriyotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için dömlü tavuk yumurtalarına enjeksiyonlar gerçekleştirildi.

Embriyotoksiste çalışmalarında kullanılan maddenin uygulama yeri, zamanı, dozu ve özellikleri (doğal, yapay formu), kullanılan çözücünün özellikleri (hacmi ve pH'sı) oldukça önem taşımaktadır (Jelinek ve Marhan 1994). Bu çalışmalarda uygulanacak kimyasalın hava kamarası, albümin ve yumurta sarısına enjeksiyonları denenmiş; uygulama ve sterilizasyon işlemlerinin kolaylığı, verilen solüsyonun hızlı ve homojen yayılması, yumurta içi basıncı artırarak embriyoda mekanik hasara yol açmaması gibi avantajları nedeniyle mevcut çalışmada kimyasalların hava kamarasına uygulanması tercih edilmiştir. Yumurtaya enjekte edilecek maddenin farklı dozlarda uygulanması, sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir (Celik ve ark. 2000, Cetinkal ve ark. 2010, Oznurlu ve Oznurlu 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda (Bülbül ve ark. 2015a, b) kanatlılarda 50 ve 200 mg/kg SNP ve L-NAME'in nitrik oksit metabolizması üzerinde etkili olduğu ifade edilmesinden dolayı bu çalışmada da benzer dozlar uygulanmıştır. Uygulama hacmi olarak da 0.025 ml (Celik ve ark. 2000) kullanılmıştır.

Kanatlılarda yumurta ağırlığı ve civciv çıkım ağırlığı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Tona ve ark. 2004). Çıkan civcivlerin büyüklüğü, doğrudan doğruya yumurta büyüklüğüne bağlıdır. Bu çalışmada çalışma öncesi gruplardaki yumurtaların ağırlıkları benzer olup 7., 14. günlerde embriyo ile çıkım günü ağırlıkları bakımından gruplar arasında fark görülmemiştir. Nitrik oksit dönürü SNP'nin yumurtaya enjeksiyon yapılarak kullanımına ilişkin daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamasına karşın, (Lepiller ve ark. 2007) zebra balığının embriyonal gelişim boyunca fizyolojik ve stres koşullarında sürekli bir NO üretimi olduğunu ifade etmektedirler. Buna karşın bu çalışmadan farklı olarak (Oznurlu ve Oznurlu 2016) yaptıkları çalışmada iNOS inhibitörü olan aynı zamanda nonsteroid antiinflamatuvar olan fluniksın megluminin dozuna bağlı olarak özellikle embriyonik dönemin 7., 11., 15. ve 18. günlerinde rölatif embriyo ağırlıkları ve embriyo uzunlukları ile kuluçkadan çıkış günü civciv ağırlıkları üzerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan L-NAME ise selektif bir NOS inhibitörü olup spesifik üç NOS enzimini (eNOS, iNOS, cNOS) de engellemektedir. Fluniksın megluminin ise NOS'tan bağımsız olarak damar genişletici bir madde olan prostaglandin sentezini engelleyerek embriyonal gelişim üzerinde olumsuz etki oluşturduğu düşünülebilir (Reppert ve ark. 2019).

Kanatlılarda dömlü yumurtalardan çıkan civcivlerin yüzdesi olarak ifade edilen çıkım oranı, kuluçka sonuçlarının değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Çıkım oranının belirlenmesinde özellikle yumurtaların bulunduğu kuluçka makinesi koşullarının uygunluğu, kuluçkalık yumurtaların seçimi ve kalite özellikleri (yumurta ağırlığı gibi), dömlülük gibi faktörler etkili olmakla birlikte (Ensminger 1992) kuluçkadaki yumurtalardaki embriyo gelişim dönemleri ile yumurtalara uygulanan maddeler çıkım oranını değiştirmektedir. Embriyotoksiste çalışmalarında gözlemlenen embriyonik ölümlerin, embriyolarda önemli yapısal ve fonksiyonel bozuklukların çoğunlukla mitoz bölünme ve hücre farklılaşmasının hızlı gerçekleştiği erken gelişme dönemlerinde yoğunlaştığı görülmüştür (Kucera ve Burnand 1987). Bu nedenle mevcut çalışmada embriyonal gelişimin 21. gününe ait mortalite ve gelişim geriliklerine göre gruplarda çıkım oranları belirlendi. Buna göre embriyonal gelişimin 21. gününe ait çıkım oranı deneme gruplarından L-NAME50 grubunda en yüksek (% 70) iken, SNP200 grubunda en düşük (% 40) olarak tespit edildi (P<0.05; Tablo 2).

Yapılan çalışmalarda NO'nun metabolizma artışı ve azalışının embriyonal gelişimi etkiledi farklı çalışmalarda saptanmıştır. Fare embriyoları üzerine yapılan çalışmada NO'nun normal embriyo gelişimi için gerekli olduğu, bir NOS inhibitörü olan N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine maruz bırakılan embriyolarda normal gelişimin inhibe edildiği gösterilmiştir (Gouge ve ark. 1998). Fare embriyolarında 0.1 - 1 µM dozundaki L-NAME'in blastosit gelişimini inhibe ettiğini, ancak 0.1 µM SNP'nin bu etkileri tersine çevirdiğini, aşırı NO'nun (≥10 µM) fare embriyolarında apoptoza neden olabileceğini bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2001). Farelerde erken embriyonik ölümlerin nedenlerinin araştırıldığı bir çalışmada (Haddad ve ark. 1995) gebe farelere gebeliğin 6. gününden itibaren oral veya parenteral olarak verilen aminoguanid'in NOS inhibisyonuna neden olduğu ve erken embriyo ölümlerini azalttığı saptanmıştır. Mevcut çalışmada bu çalışmadaki verilere uyumlu olarak SNP verilen iki grupta da çıkımdaki ölüm oranı (SNP50: % 46.7; SNP200: % 60), L-NAME verilen iki gruptaki ölüm oranına (L-NAME50: % 30; L-NAME200: % 40) göre daha yüksek olarak saptandı.

Bu çalışmada SNP'nin yüksek dozda uygulandığı grupta 21. günde embriyolarda gelişme geriliğinin arttığı tespit edildi. Embriyo tarafından da üretilmekte olan NO, endometriyumda lokal damar genişlemesi ile hormonlar veya sitokinlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanında NO, embriyoda damarlaşmayı artırmaktadır. Ancak oluşan NO'nun fizyolojik sınırlarda kalmasının önemli olduğu, yüksek düzeylerdeki NO'nun, embriyodaki apoptozisi uyarak embriyo kaybına neden olabileceği bildirilmektedir. Nitrik oksit eksikliğinde de süperoksit radikali yeterince uzaklaştırılmadığı için embriyonik hücrelerde hasar meydana geldiği ve embriyonik kayıp olduğu belirtilmektedir (Blashkiv ve ark. 2001, Chen ve ark. 2001). Bu çalışmada da NO donörü olan SNP200 grubunda görülen çıkım oranındaki azalma her embriyonun kendi gelişim sürecine bağlı olabileceği gibi, SNP'nin yüksek dozunun etkisiyle (SNP'nin yüksek dozuna embriyonun duyarlı olduğu) vitellin damarların yapısındaki bozulmaya bağlı olarak embriyoların yeterli beslenememesinden kaynaklanan gelişme bozuklukları ve ölüm oranı artışlarının (son dönem embriyo ölümlerinin) bu dönemde görülmesinden kaynaklanabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada embriyonik gelişim döneminde NO metabolizmasında değişikliklerin embriyonal gelişimi bozduğu; özellikle NO donörü SNP'nin daha belirgin embriyotoksik etki gösterdiği görüldü. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarda doz ve grup sayılarının artırılması, embriyolarda organların histolojik yapılarının incelenmesi, stereolojik olarak hücre sayımı ve hacim hesaplamalarının yapılmasının NO'nun embriyo üzerine etkilerinin daha detaylı olarak anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 18.KARIYER. 253 No'lu proje numarası ile desteklenmiştir.

**YAZAR KATKILARI**

Fikir/Kavram: TB, VÖ  
 Tasarım: TB, VÖ, MAA, MT  
 Denetleme/Danışmanlık: MAA, HA, MSA, AÇD, İT  
 Veri Toplama ve/veya İşleme: TB, VÖ  
 Analiz ve/veya Yorum: TB, VÖ, MAA, MT  
 Kaynak Taraması: TB, VÖ  
 Makalenin Yazımı: Makalenin Yazımı: TB, VÖ  
 Eleştirel İnceleme: TB, VÖ, MAA, MT

**KAYNAKLAR**

- Blashkiv TV, Korniihuk AN, Voznesenskaya TY, Pornichenko AG (2001).** Role of nitric oxide in ovulation, meiotic maturation of oocytes, and implantation in mice. *B Exp Biol Med*, 132(5), 1034-1036.
- Bulbul T, Akosman MS, Yılmaz O, Ulutas E, Bulbul A (2015a).** Supplementary dietary nitric oxide donor (sodium nitroprusside) or inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester) depressed growth performance and ovarian primordial and primary follicles in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in a dose-dependent manner. *Br Poult Sci*, 56(1), 113-120.
- Bulbul A, Bulbul T, Ozdemir V, Akosman MS, Ulutas E, Yılmaz O. (2015b).** Biphasic effect of nitric oxide on development of ovarian primordial and primary follicles in laying quail. *Eur Poultry Sci*, 79-90.
- Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. (2001).** Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril*, 75, 1163-1171.
- Choi YH, Ohno N, Okumura J, Furuse M. (1996).** Effects of peripheral nitric oxide on food intake in the chick. *J Poult Sci*, 33(5), 286-291.
- Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL. (1990)** Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg*, 212, 462-71.
- Celik I, Oguz H, Demet O, Boydak M, Donmez HH, Sur E, Nizamlioglu F. (2000).** Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* Nrrl 2999. *Br Poult Sci*, 41, 401-409.
- Cetinkal A, Colak A, Topuz K, Demircan MN, Simsek N, Berber U, Umur AS, Selcuk M, Vatansver HS (2010).** The effects of meloxicam on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Turk Neurosurg*, 20, 111-116.
- Ensminger, ME. (1992).** Poultry Science. Interstate Publishers, Inc. 510 North Vermilion Street. P.O. Box 50. Printed in USA, Chapter. 3, 43-63.
- Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM (1998).** Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod*, 58, 875-879.
- Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF (1995).** Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol*, 293, 287-290.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951).** A series of normal stages in the development of chick embryo. *J Morphol*, 88, 49-92.
- Heinrich-Hirsch B, Neuberti D (1991).** Effect of aciclovir on the development of the chick embryo in ovo. *Arch Toxicol*, 65, 402-408.
- Jelinek R, Marhan O (1994).** Validation of chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study. *Funct Dev Morphol*, 4, 317-323.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z (1985).** Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Exp Biol*, 23, 588-595.
- Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR (2001).** The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 1, 1421-1441.
- Knowles RG, Moncada, S (1994).** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298(2), 249-258.
- Kucera P, Burnand MB (1987).** Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro. *Teratog Carcinog Mutagen*, 7, 427-447.
- Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, Herbolme P, Solary E, Chluba J (2007).** Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic Biol Med*, 43, 619-627.
- Manwar SJ, Moudgal RP, Sastry KVH, Mohan J, Tyagi JBS, Raina R (2006).** Role of nitric oxide in ovarian follicular development and egg production in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Theriogenology*, 65, 1392-1400.
- Moncada S, Higgs A (1993).** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002-2012.
- Öznurlu M, Öznurlu Y (2016).** Erken dönemde yumurtaya enjekte edilen flunixin megluminin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 32, 260-267.
- Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL, Thompson BK (1987).** Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *J Assoc Off Anal Chem*, 70, 1049-1055.
- Reppert EJ, Kleinhenz MD, Montgomery SR, Heiman J, Sura A, Bornheim HN, Magnin G, Sidhu PK, Zhang Y, Joo H, Coetzee JF, (2019).** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and transdermal flunixin meglumine in alpacas. *J Vet Pharmacol Ther*, 42(5), 572-579.
- Tona K, Onagbesan O, De Ketelaere B, Decuypere E, Bruggeman V. (2004).** Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight and chick posthatch growth to forty-two days. *J Appl Poultry Res*, 13, 10-18.
- Ubeda A, Trillo MA, Chacon I, Blanco MJ, Jocelyne I. (1994)** Chick embryo development can be irreversibly altered by early exposure to weak extremely-low-frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 15, 385-398.
- Unlu A. (2002).** Methods of developmental research. *Acta Neurochir (Wien)*, 83, 71-78.



## Effect of Body Condition Score on Estrus-Ovulation Synchronization and Pregnancy in Cows and Heifers

Volkan KOŞAL<sup>1,\*</sup> Fetih GÜLYÜZ<sup>2</sup> Barış Atalay USLU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yuzuncu Yil University, Van, Turkey

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, Antalya, Turkey

<sup>3</sup> Department of Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Aki Ersoy University, Burdur, Turkey

Received: 15.12.2020

Accepted: 05.02.2021

### ABSTRACT

The most important factors affecting the success of artificial insemination are the balanced nutrition of the animals and the determination of estrus. Malnutrition causes a decrease in the Body Condition Score (BCS). Low BCS affects the deterioration of the metabolism of cows which has a primary influence on estrus and offspring productivity. In this study, estrus and ovulation synchronization was performed by forming three study groups from cows and heifers with a maximum BCS average of 2.95. Cows that were 3 - 6 years old were included in Group I (n = 12) (BCS: 2.95 ± 0.62), heifers between 18-22 months of age and showing at least 1 estrus were included in Group II (n = 13) (BCS: 2.03 ± 0.37) and heifers between 18-22 months of age were included in Group III (n = 45) (BCS: 1.57 ± 0.38). Progesterone Implants remained in the vagina for 10 days in all groups. One day before removal of implants, 2000 IU PMSG and 5 ml PGF2α was injected to all groups. All animals were injected with 1500 IU hCG 24 hours after the implants were removed. After removal of implants, all animals were inseminated at 48 and 72 hours regardless of estrus symptoms. According to the groups, pregnancy rates of 58.33%, 38.46% and 13.33% were obtained, respectively. When the results were compared, it was found that the BCS rate and pregnancy rates were parallel (P<0.01). In line with these results, the importance of feeding and giving birth before has been revealed.

**Keywords:** Body Condition Score, Cattle, Fertility, Synchronization

### ÖZ

## İnek ve Düvelerde Vücut Kondisyon Skorunun Östrus-Ovulasyon Senkronizasyonu ve Gebelik Üzerine Etkisi

Suni tohumlamanın başarısını etkileyen en önemli faktörler, hayvanların dengeli beslenmesi ve kızgınlığın belirlenmesidir. Kötü beslenme, Vücut Kondisyon Skorunda (VKS) bir azalmaya neden olur. Düşük VKS, sığırlarda hormon metabolizmasının bozulmasına, kızgınlık tespitinin zorlaşmasına ve döl veriminde azalmaya sebep olur. Bu çalışmada maksimum VKS ortalaması 2.95 olan inek ve düvelerden üç çalışma grubu oluşturularak östrus ve ovulasyon senkronizasyonu gerçekleştirilmiştir. Uygulama grupları; Grup I (n = 12) (VKS: 2.95 ± 0.62), Grup II (n = 13) (VKS: 2.03 ± 0.37) 18 - 22 aylık düvelerde en az 1 doğum yapan 3 - 6 yaş arası inekler, Grup III'de (n = 45) (VKS: 1.57 ± 0.38) en az 1 kızgınlık gösteren 18 - 22 aylık düveler kullanıldı. Tüm gruplarda progesteron implantları vajinada 10 gün kaldı. İmplantlar çıkartılmadan bir gün önce tüm hayvanlara 2000 IU PMSG ve 5 ml PGF2α enjekte edildi. İmplantlar 24 saat sonra çıkarıldı ve 1500 IU hCG enjekte edildi. İmplantlar çıkarıldıktan sonra 48. ve 72. saatlerde östrus semptomlarına bakılmaksızın tüm hayvanlar tohumlandı. Gruplara göre sırasıyla 58.33%, 38.46% ve 13.33% gebelik oranları elde edildi. Sonuçlar karşılaştırıldığında VKS oranı ile gebelik oranlarının paralel olduğu görüldü (P<0.01). Bu sonuçlar doğrultusunda beslenmenin ve daha önce doğum yapmanın önemi ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Fertilité, Senkronizasyon, Sığır, Vücut kondisyon skoru

### INTRODUCTION

One of the most important criteria determining success in modern dairy farms is keeping the fertility at the optimum level. Many studies have shown that environmental factors (care, feeding, management, etc.) are more effective than

genetic factors on total productivity (Ayres et al. 2014; Vasconcelos et al. 1999). In order to keep bovine animals stay healthy; they should be fed with an appropriate diet adapted to their age, weight, behavior, physiological needs, and expected yield (Ergün et al. 2014). Management and nutrition, has a direct effect on the Body Condition Score



(BCS) of the animal. BCS is the evaluation of the body structure of dairy cattle according to being weak or excessively fat which is scored between 1 and 5. In this system, 1 refers to cachectic animal and 5 refers to excessively fatty animal. Optimum BCS should be between 2.5 - 3 point. (Wildman et al. 1982). It has been reported that BCS is associated with the increase in calving interval, milk yield, pregnancy rate, calving difficulty, weaning weight (Funston 2010; Varışlı and Tekin 2011). A negative energy balance is observed in animals with the decrease in BCS (Garnsworthy et al. 2008a). These changes in carbohydrate and energy metabolism negatively affect metabolic hormones. The secretion disorders of metabolic hormones impair reproductive hormones and ovary functions (Garnsworthy et al. 2008b; Webb et al. 2004). In cows and heifers with a low BCS rate, a decrease in LH release, estrogen release, no estrus symptoms, ovulation disorders, fertilization problems, early embryonic deaths, and pregnancy rates are observed (Butler 2003; Freret et al. 2005; Froment 2007). Edmonson et al. (1989) created a detailed measurement scale to accurately determine BCS in cows and heifers. According to this:

1- Pelvis bones and *Processus transversus* are seen. Depressions in the *Sacrum* area are evident. There is no fat layer in the pelvis and back area. Pelvis ligaments are prominent.

2- Pelvis bones can be felt. *Processus transversus* are not very prominent. However, pressure can be felt. *Sacrum* region is hollow and there is a light layer of fat at the bone ends. Pelvis ligaments are less pronounced.

3- Pelvis bones can be felt under slight pressure. *Processus transversus* can be felt with a strong pressure. The *Sacrum* area is filled with a layer of fat. Pelvis bones are visible, but the triangular-like image formed between them has turned into a round.

4- Pelvis bones can be felt under very strong pressure. *Processus transversus* cannot be felt. *Sacrum* area is full of fat layer. The back and waist area are straight. The pelvis bones are rounded and filled with a layer of fat.

5- Pelvis bones cannot be felt. *Sacrum* area is filled with fat layer and it has become round. The back and waist area are straight. The ribs are covered with a layer of fat. The coccyx is not evident (Edmonson et al. 1989).

Exogenous hormone applications and sexual synchronization together with fixed-time artificial insemination applications are offered as an important solution in the absence of estrus and ovulation due to the deterioration of metabolic balance and the disruption of the release mechanisms of reproductive hormones. For this purpose, progesterone, PGF2 $\alpha$ , estrogen, eCG, hCG, LH, PMSG, FSH hormones are preferred. With protocols created with different combinations of these hormones, pregnancy can be achieved without the need to detect estrus symptoms (Dhami et al. 2019; Ferreira et al. 2006; Singh et al. 2019; Vale et al. 2011).

This study was conducted in a livestock operation that wanted to sell pregnant heifers and cows to dairy farms. The aim of this study was to investigate the effect of progesterone containing devices and additional hormone applications on estrus and pregnancy rates on heifers and cows who cannot be fed adequately and balanced until puberty and have low BCS.

## MATERIAL and METHODS

### Animals

Animals material of this study consisted of 18 months and 6 years old cows and heifers in Denizli Province. Animals kept in three different barns within the same enterprise were primarily evaluated according to their BCS and barn-based groups were formed.

The ethics committee report of this study was obtained from Van Yuzuncu Yil University Animal Experimentals Local Ethics Committee. (Date:03.12.2020 Decision Number: 2020/11-05)

### Animal Groups and Application

The animals in the enterprise are grouped according to their shelters. First of all, the general examination of all animals and then the examination of their genital organs were made. Animals with any disease were not included in the study. The groups are formed as follows; Group I (n = 12) (BCS = 2.95  $\pm$  0.62): The animals in this group were 3 - 6 years old cows. Group II (n = 13) (BCS = 2.03  $\pm$  0.37): The animals in this group consisted of 18 - 22 months old heifers showing at least 1 estrus. Group III (n = 45) (BCS = 1.57  $\pm$  0.38): The animals in this group consisted of 18 - 22 months old heifers that did not show any estrus. BCS of animals according to groups were determined according to the scale of Edmonson et al. (1989) before starting the application. The same synchronization protocol was applied to the animals in all groups (Table 1). The day the implants are placed is determined as day 0.

**Table 1.** Application schedule.

Days	Application
Day 0	Placement of Progesterone Implant Intra - Vaginal 1.00 gr, DIB®, Vilsan, Turkey
Day 9	2000 IU PMSG IM Folligon, Intervet, Turkey + 5 ml PGF2 $\alpha$ IM Dinolitic®, Upjohn, USA
Day 10	Removal of the Progesterone Implant
Day 11	1500 IU hCG IM Chorulon®, MSD, USA
Day 13	AI
Day 14	AI

\*AI: Artificial insemination IM: Intramuscular

### Artificial Insemination And Pregnancy Examination

All animals were inseminated by the same person. Frozen-thawed straws used in artificial insemination. All animals were inseminated at 48 and 72 hours regardless of estrus symptoms. Sperm samples had minimum 70% motility rate and a maximum of 20% abnormal and dead-alive sperm rate. Pregnancy examinations were performed by recto-vaginal method on the 45th day after insemination.

### Statistical Analysis

All statistical analysis was performed by using SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) package program for

Windows. Chi - Square Test was used to evaluate the differences between groups for pregnancy rate. For all comparisons, differences were considered with a minimum of 0.05 significance level.

## RESULTS

A total of 70 animals in 3 groups were used in the study. The highest pregnancy was obtained in Group I consisted of 3 - 6 year old cows. The lowest pregnancy was obtained in Group III, that were consisted of heifers aged 18 - 22 months and never showed estrus to date. BCS rates and pregnancy rates were compared, a statistically significant difference was found ( $P < 0.01$ ). It was found that the decrease in BCS decreased the pregnancy rates (Table 2).

**Table 2.** Pregnancy rates.

Group	Pregnancy (%)	P
Group I (n=12)	58.33 <sup>a</sup>	
Group II (n=13)	38.46 <sup>b</sup>	$P < 0.01$
Group III (n=45)	13.33 <sup>c</sup>	

\*Different letters within the same column demonstrate significant differences ( $P < 0.05$ )

## DISCUSSION and CONCLUSION

Genetic and non-genetic factors affect reproductive performance. Among these factors, the effect of genetics is 20%, while the non-genomic effect accounts for 80%. The most important factors affecting non-genetic factors are environment and nutrition. The effect of nutrition on this rate is around 50% (Ayres et al. 2014; Lotthammer 1991; Vasconcelos et al. 1999).

In this study, fixed-time artificial insemination was performed by synchronizing estrus and ovulation in order to reveal the importance of BCS values related to nutrition. This study demonstrated that, when BCS and pregnancy rates were examined, a correct ratio was found between them and it was determined that the average 1.5 points of BCS difference caused a 45% decrease in the pregnancy rate ( $P < 0.01$ ). Likewise, Lopez et al. (2003) reported that a 1 - point decrease in BCS value has negative effects on pregnancy. In addition, Bo et al. (1995) stated that animals with a BCS value of less than 2 have a very low chance of becoming pregnant. The reason for the low pregnancy rates in Group 1 and 2 (38% - 13%) can be explained by these factors.

Kasimanickam et al. (2012) found pregnancy rates in the range of 54.9 - 69.2% in a synchronization study using progesterone, PGF2 $\alpha$  and GnRH in heifers with a BCS ratio of 2.5 - 3.5. In a study, Luiz et al. (2017) used progesterone, PGF2 $\alpha$ , estrogen, eCG in primiparous and multiparous animals with a BCS rate ranging from 2.3 - 3 and reported the pregnancy rates in primiparous animals as 33 - 45% and in multiparous animals as 60-64 %. Williams et al. (2002) in the synchronization study performed in cows and heifers with BCS 2.7-2.9, pregnancy rates were reported as 40% in heifers and 45 % in cows. Guilherme et al. (2004), in a study using Progesterone + Estrogen + eCG + GnRH in study groups with BCS rates of 2 / 2.5 / 3, they found pregnancy rates as 30 / 47.6 / 66.6%, respectively. Although the synchronization protocol used in this study and the protocol applied by Guilherme et al. (2004) were similar, the pregnancy rates showed a parallelism only

with Group 1. The fact that the animals in Group 2 - 3 were heifers and their low BCS values explain the big difference between pregnancy rates. Low BCS rates lead to prolongation of anestrus duration (Hess et al. 2005), insufficient LH release, poor oocyte quality (Bo et al. 1995), negative energy balance (Butler 2005), suppression of reproductive hormones (Garnsworthy et al. 2008; Webb et al. 2004). For these reasons, the decrease in pregnancy rate is an inevitable result.

In addition to exogenous progesterone applications, with PMSG and hCG administration, a pregnancy is obtained in cow (58%) and heifers (38% - 13%) even if it is low. For the continuation of estrus and ovulation in a healthy way, the animals should have a BCS value of at least 2.5. Another issue that should be emphasized is that even if pregnancy is achieved in animals with low BCS rates with exogenous hormone applications; the maintenance of these pregnancies in a healthy way and bearing of the metabolism of this burden remain as an important issue that needs to be investigated.

## CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: VK, FG, BAU

Design: VK, FG, BAU

Supervision / Consultancy: VK, FG, BAU

Data Collection and / or Processing: VK, FG, BAU

Analysis and / or Interpretation: VK, FG, BAU

Literature Review: VK, FG, BAU

Writing the Article: VK, FG, BAU

Critical Review: VK, FG, BAU

## KAYNAKLAR

- Ayres H, Ferreira RM, Torres-Júnior JRS et al (2014). Inferences of body energy reserves on conception rate of suckled Zebu beef cows subjected to timed artificial insemination followed by natural mating. *Theriogenology*, 82, 529-536.
- Bastos G, Brenner RH, Willke FW et al (2004). Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology*, 62, 847-853.
- Bo GA, Adams GP, Caccia M (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*, 39, 193-204.
- Borakhatariya DN, Panchal MT, Dhami AJ, Hadiya KK, Kalasariya RM (2017). Efficacy of estrus synchronization protocols during summer and winter seasons together with biochemical and minerals profile in anestrus crossbred cows. *IJVSBT*, 13, 9-16.
- Butler WR (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*, 83, 211-218.
- Butler WR (2005). Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. *Livest Prod Sci*, 98, 5-12.
- Dhami AJ, Hadiya KK, Patel JA, Chaudhari DV (2019). Impact of ovulation synchronization protocols in addressing infertility of crossbred dairy cattle. *Haryana Vet*, 58, 56-61.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 72, 68-78.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan L et al (2014). Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Pozitif Matbaa, Ankara.
- Ferreira RM, Rodrigues CA, Ayres H et al (2006). Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Anim Reprod*, 3, 370-375.
- Ferret S, Charbonnier G, Congnard V, Jeanguyot N, Dubois P, Levert J (2005). Relationship between oestrus expression and detection, resumption of cyclicity and body condition losses in postpartum dairy cows. *3R Congress*, 12, 149-152.



- Froment P (2007).** Note d'état corporel et reproduction chez la vache laitière [thesis]. École nationale vétérinaire d'Alfort: La Faculté De Médecine De Creteil.
- Funston R (2010).** Nutrition and reproduction interactions. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, January 28-29, San Antonio, TX.
- Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD, Webb R (2008).** Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function, *J Dairy Sci*, 91, 3814-23.
- Garnsworthy PC, Sinclair KD, Webb R (2008).** Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*, 2, 1144-52.
- Hess BW, Lake SL, Schollejegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC (2005).** Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci*, 83, 90-106.
- Kasimanickam R, Asay M, Firth P, Whittier WD, Hall JB (2012).** Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with five-day CO-Synch controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology*, 77, 1624-1631.
- López-Gatius F, Yániz J, Madriles Helm D (2003).** Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: A meta-analysis. *Theriogenology*, 59, 801-812.
- Lotthammer KH (1991).** Influence of nutrition on reproductive performance of the milking/gestating cow in the tropics. *FDCT*, 86, 59-74.
- Luiz FMP, Natália AC, Paulo MAN, Jamyle PC, Luiz GBS (2017).** Development and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. *Live Sci*, 197, 82-87.
- Singh M, Sharma A, Kapse S, Kashyap A, Kumar P (2019).** Efficacy of different estrus synchronization protocols in repeat breeder cows. *IJAN*, 89, 958-960.
- Vale WG, Melo PCH, Walter E et al (2011).** Fixed timed artificial insemination (FTAI) through the progesterone (CIDR) of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> uses in bovine. I. Conception rate related to reproductive category, related to body condition scoring (BCS), related to calf withdrawal and use of eCG. *LRRD*, 23, 205.
- Varışlı Ö, Tekin N (2011).** Holştayn ırkı ineklerde vücut kondisyon skorunun fertilitite ve bazı reproduktif parametrelere etkisi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 58, 111-115.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC (1999).** Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067-78.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG (2004).** Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*, 82, 63-74.
- Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Bowman RL (1982).** A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci*, 65, 495-501.
- Williams SW, Stanko RL, Amstalden M, Williams GL (2002).** Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. *J Anim Sci*, 80, 1173-1178.



## Immunohistochemical Investigation of Oxidative Stress-induced DNA Damage and Lipid Peroxidation in Bovine Papillomas and Fibropapillomas

Emin KARAKURT 

*Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kars, 36100, Turkey*

Received: 20.12.2020

Accepted: 26.01.2021

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to evaluate the expressions of 8-OHdG and MDA immunohistochemically in order to determine the oxidative stress-induced DNA damage and lipid peroxidation in 16 papillomas and 14 fibropapillomas from 30 cattle brought to our department between 2013-2020. Biopsy samples taken after surgery were fixed in buffered 10% formaldehyde solution. Sections of 5 µm thickness were taken from the paraffin blocks prepared after routine tissue follow-up procedures and Hematoxylin & Eosin staining was applied to the sections in order to detect histopathological changes. Avidin Biotin Peroxidase method was used for immunohistochemical staining. In papilloma cases, severe hyperkeratosis, retepecks extending from the epidermis to the dermis, spongiosis and balloon-like degeneration in squamous epithelial cells, basophilic inclusion bodies in granular cells, ulcerations in the epidermis layer, hemorrhagic areas and an increase in kerato hyaline granules were observed. In addition to these findings, dense connective tissue increases were detected in fibropapilloma cases. In immunohistochemical evaluations, positive reactions for BPV were observed in the nuclei of cells in stratum granulosum. 8-OHdG positive reactions were detected in the cytoplasm and nucleus of the epidermal cells in papilloma cases, whereas in cases of fibropapilloma, reactions in these cells were observed in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts in the dermis. Membranous MDA positive reactions were observed in the epidermal cells in papilloma cases, whereas MDA expressions were detected in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts in the dermis of fibropapilloma cases. As a result of the literature reviews, no study data was found in which DNA damage due to oxidative stress and lipid peroxidation was detected by means of 8-OHdG and MDA expressions in papilloma and fibropapilloma cases of cattle, it is thought that the findings obtained in this study will contribute to the literature. In addition, it has been concluded that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of this tumor.

**Keywords:** DNA damage, Lipid peroxidation, Oxidative stress, Papilloma

### öz

## Sığır Papillom ve Fibropapillomlarda Oksidatif Stres Kaynaklı DNA Hasarı ve Lipid Peroksidasyonun İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

Bu çalışmada 2013-2020 yılları arasında anabilim dalımıza getirilen toplamda 30 adet sığırlara ait 16 adet papillom ve 14 adet fibropapillom örneğinde oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu belirlemek amacıyla immunohistokimyasal olarak 8-OHdG ve MDA ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlandı. Cerrahi operasyon sonrası alınan biyopsi örnekleri tamponlu %10'luk formaldehit solüsyonunda fikze edildi. Rutin doku takip işlemleri sonrası hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve histopatolojik değişikliklerin saptanabilmesi amacıyla kesitlere Hematoksilin & Eozin boyaması uygulandı. İmmunohistokimyasal boyamalarda Avidin Biotin Peroksidaz metodu uygulandı. Papillom vakalarında şiddetli hiperkeratoz, epidermisten dermise doğru uzanan retepektler, skuamöz epitel hücrelerinde spongiyozis ve balonumsu dejenerasyon, granüler hücrelerde bazofilik inklüzyon cisimcikleri, epidermis katmanında ülserasyonlar ve kanama alanları ile kerato hiyalin granüllerinde artış gözlemlendi. Fibropapillom vakalarında ise bu bulgulara ek olarak girdap tarzında bağ doku artışları tespit edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde ise BPV pozitif reaksiyonlar stratum granulozumdaki hücrelerin çekirdeğinde gözlemlendi. 8-OHdG pozitif reaksiyonlar papillom vakalarında epidermal hücrelerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde saptandı, fibropapillom vakalarında ise bu hücrelerdeki reaksiyonlara ek olarak dermisteki fibrosit ve fibroblastların sitoplazmasında rastlandı. Papilloma olgularında epidermal hücrelerde membranöz MDA pozitif reaksiyonlar görülürken, fibropapilloma vakalarının dermisinde fibrosit ve fibroblastların sitoplazmasında MDA ekspresyonları tespit edildi. Yapılan literatür taramaları sonucunda sığırlara ait papillom ve fibropapillom vakalarında oksidatif strese bağlı DNA hasarı ile lipid peroksidasyonun 8-OHdG ve MDA ekspresyonları vasıtasıyla tespit edildiği herhangi bir çalışma verisine rastlanmamış olup ve bu yönüyle bu çalışmada elden edilen bulguların literatüre katkı sunacağı düşünülmektedir. Bunlara ek olarak oksidatif stresin bu tümörün patogenezinde önemli bir rol oynadığı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** DNA hasarı, Lipid peroksidasyon, Oksidatif stres, Papillom



## INTRODUCTION

Bovine papillomatosis is usually a benign tumor characterized by the development of multiple warts (Atasever et al. 2005; Beytut 2017). Bovine papilloma viruses (BPV), the etiological agent of bovine papillomatosis, has a double-stranded circular, 8-kb DNA genome belonging to Papillomaviridae family (Grindatto et al. 2015; Araldi et al. 2015; Timurkan and Alcigir 2017). There is currently 24 known BPV types (Bianchi et al. 2020). Viral replication takes place in the nucleus, as infected cells are lysed and new virions are released (Hong and Kim 2015). These viruses show an affinity for mucosal tissues and squamous epithelial as well as mesenchymal tissue (Araldi et al. 2014; Hamad et al. 2016). Although these viruses show tropism to the squamous epithelium of warm-blooded animals, particularly cattle, cross-species infection has been reported only in horses and other equines (AL-Salihi et al. 2020). BPV, which is highly species specific and has been detected in water buffaloes, bison, giraffes, zebras, antelopes, yak, horses, donkeys, tapirs, and other species (da Silva et al. 2015; Rojas-Anaya et al. 2016). Although the tumor is seen at all ages, it is mostly detected in young animals and regresses spontaneously with the development of immune systems (Atasever et al. 2005; Özsoy et al. 2011). Sometimes this process progresses towards cancer (Tozato et al. 2013; Hamad et al. 2017). Warts caused by papillomaviruses, known as epitheliotropic, are mostly seen on the scalp, tongue, breasts, penis, vulva, oral cavity and upper digestive tract (Munday 2014; Rojas-Anaya et al. 2016). BPV cause significant economic losses (growth reduction, weight loss, decreased milk production) by causing benign and malignant tumors such as cutaneous papillomas, fibropapillomas, bladder and esophageal cancers in cattle (Carvalho et al. 2013; Hamad et al. 2017; Timurkan and Alcigir 2017). This viral disease is distributed in many region of the world such as America, Europe and Asia (Ata et al. 2018). BPV can be scattered through contaminated milking and care equipment, contact with infected animals, and have also been detected in epithelial tissue and blood interpreted as infection reservoirs in studies. In addition to these, there are serious findings that it can be transmitted by lymphocytes, milk, urine, oocyte, ovaries and uterus (Araldi et al. 2015; Rojas-Anaya et al. 2016; Dörttaş and Bilge Dağalp 2020). Heredity, hormonal and nutritional disorders, sunlight and the suppressed immune system play a serious role in the pathogenesis of the disease (Atasever et al. 2005; Özsoy et al. 2011).

Free radicals are highly reactive chemical products that occur during metabolism in the body, and they interact with macromolecules such as lipids, carbohydrates, proteins and nucleic acids, causing oxidative damage (Atmaca and Aksoy 2009; Özcan et al. 2015). Under normal conditions, there is a balance in the production of free oxygen radicals and radical toxicity and antioxidant system that has a scavenging effect against them. The disruption of this balance between antioxidants and oxidants in favor of oxidants is called oxidative stress (Tabakoğlu and Durgut 2013; Özcan et al. 2015). Reactive oxygen species (ROS) cause more than 20 oxidative base damage products in DNA. Among these damaged bases, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is the most used marker in determining oxidative DNA damage (Atmaca and Aksoy 2009; Özcan et al. 2015). The severity of oxidative damage can be determined by measuring the levels in blood and tissues of the end products that are accepted as specific indicators such as Malondialdehyde

(MDA) resulting from lipid peroxidation (Sasmaz et al. 2005; Aslan and Saraç 2011).

In this study, it is aimed to evaluate the expressions of 8-OHdG and MDA immunohistochemically in order to determine the oxidative stress-induced DNA damage and lipid peroxidation in bovine papilloma and fibropapilloma samples brought to our department between 2013-2020.

---

## MATERIALS and METHODS

### Animals

The material of this study consisted of tissue samples of 16 papilloma, 14 fibropapilloma and 6 normal bovine skin tissues taken from cattle brought to our department between 2012-2020.

### Ethical Approval

The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experimentals Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK-2020/164).

### Histopathological Investigations

Tissue samples taken after surgery 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. Sections were examined and photographed under a light microscope.

### Immunohistochemical Investigations

Avidin-Biotin Peroxidase method was used as immunohistochemical method. For immunohistochemical staining, the sections of 4 µm in thickness taken to poly-L-lysine coated slides were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols. In order to prevent endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide solution in Phosphate Buffered Saline (PBS) for 15 minutes. For antigen retrieval, the sections were boiled in Citrat Buffer Solution (pH 6) for 25 min in the microwave oven (at 800 watt). In order to prevent nonspecific staining, the sections were incubated for 10 min with non-immune serum (Thermo Scientific Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) at room temperature. Diluted antibodies (BPV: MyBioSource, MBS320197, Dilution Ratio: 1/100; 8-OHdG: Bioss Antibodies, bs-1278R, Dilution Rate: 1/800, MDA: Abcam, ab6463, Dilution Rate: 1/250) were incubated for overnight (+ 4 °C in refrigerator). The sections were washed 3 times in PBS solution for 5 minutes, and the biotinylated secondary antibody (Thermo Scientific, Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) was applied to them at room temperature for 10 minutes. After washing in PBS (3-5 min), all sections were incubated with peroxidase-bound Streptavidin (Thermo Scientific, Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) for 10 minutes at room temperature. A solution of 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) (Thermo Scientific, REF: TA-125-HD) was used as a chromogen for 15 minutes. The sections were treated with Mayer's Hematoxylin for 30 second and washed in running water for 5 min, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene and coated with entellan. Primary antibodies were omitted from the negative control sections and were treated with diluted normal serum (goat). The slides prepared after the covering were examined under a light microscope (Olympus Bx53) and photographed via the Cell^P program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH,

3,4). Analyzes of the images were done with Image J Program. Results were evaluated as negative (-), mild (+), moderate (++) and severe (+++).

#### Statistical Analysis

The significance of the difference between the histopathologically scored data between the groups was evaluated with the Mann-Whitney U test. All analyzes were performed on the SPSS® (Version 18.0, Chicago, IL, USA) program. Differences obtained between groups after statistical analysis were considered significant at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### Macroscopical Results

In macroscopic examination of the masses, wart-like growths with or without a stalk in the form of cauliflower were observed (Figure 1).



**Figure 1.** Macroscopic appearance of papilloma.

### Microscopical Results

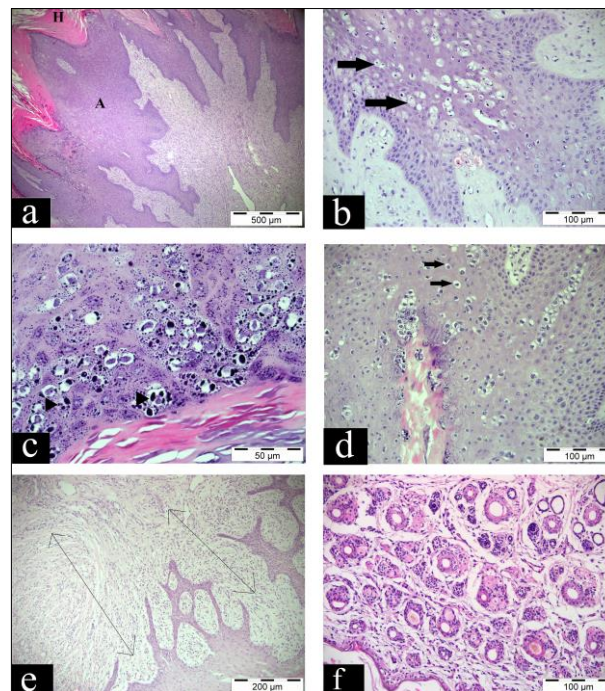
In papilloma cases, severe hyperkeratosis in the stratum corneum layer (Figure 2 a), acanthosis characterized by hyperplasia of stratum spinosum cells (Figure 2 a), and finger-like structures (rete pegs) extending from the epidermis to the dermis were detected. In addition to these, severe degeneration in keratinocytes in the stratum spinosum layer (Figure 2 b), increase in large and small keratohyaline granules in the stratum granulosum layer (Figure 2 c), and coilocytes with transparent cytoplasm with eccentric localized pycnotic nuclei in the stratum spinosum and granulosum layer were observed (Figure 2 d).

Few mitotic figures, areas of hemorrhage and ulceration, and inflammatory cell infiltration were other important histopathological findings. In the fibropapilloma cases, in addition to these histopathological changes, dense connective tissue bundles were determined in different directions between the rete peg structures (Figure 2 e). There were no any pathological changes found in normal bovine skin tissue (Figure 2 f).

### Immunohistochemical Results

In immunohistochemical evaluations, BPV immune positive reactions were detected in the nucleus of cells in the stratum granulosum layer of the epidermis all papilloma and fibropapilloma cases (Figure 3 a-b). 8-OHdG positive reactions were determined in the cytoplasm and

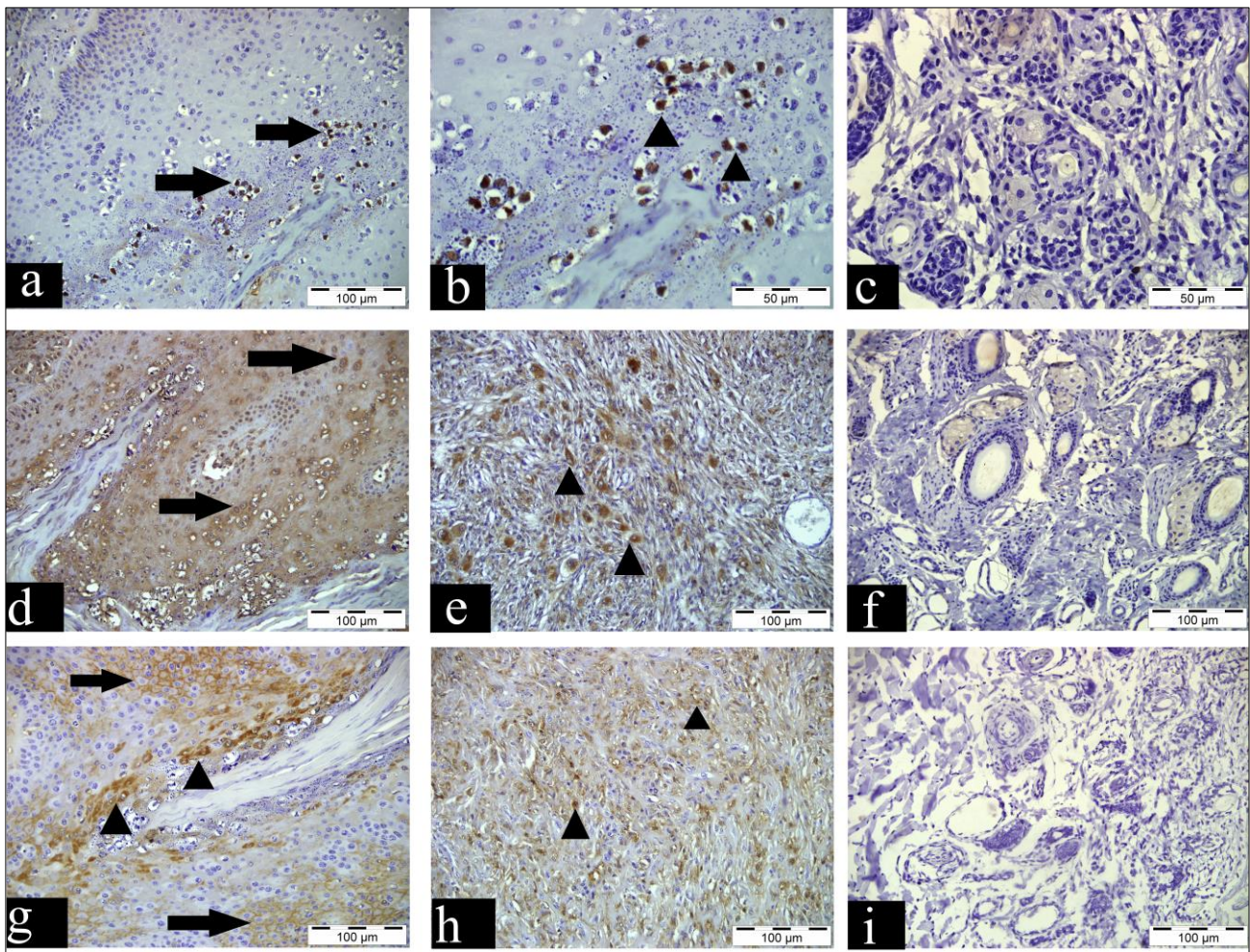
nucleus of the epidermal cells in all papilloma cases (Figure 3 d), whereas in all cases of fibropapilloma, reactions in these cells were observed in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts in the dermis (Figure 3 e). Membranous MDA positive reactions were observed in the epidermal cells in all papilloma cases (Figure 3 g), whereas MDA expressions were detected in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts in the dermis of all fibropapilloma cases (Figure 3 h). Normal bovine skin tissue was negative for BPV, 8-OHdG and MDA expressions (Figure 3 c-f-i).



**Figure 2.** Hyperkeratosis (H), acanthosis (A), H&E, Bar= 500 µm (a), Hydropic degeneration in keratinocytes (arrows), H&E, Bar = 100 µm (b), Keratohyaline granules (arrowheads), H&E, Bar= 50 µm (c), Koilocytosis, H&E, Bar= 100 µm (d), Dense bundles of connective tissue in different directions between rete ridge structures (lines), H&E, Bar = 200 µm (e), Normal bovine skin tissue, H&E, Bar= 100 µm (f).

### Statistical Results

Mean  $\pm$  SE mean and median values of all groups are given in Table 1. A statistically significant increase found in the papilloma and fibropapilloma groups in terms of BPV reactions compared to the control group. In terms of 8-OHdG immune positive expressions, a significant increase found in papilloma and fibropapilloma groups compared to the control group. In addition, the increase in 8-OHdG immune positive reactions was statistically more significant in papilloma groups than in fibropapilloma groups. In terms of MDA expressions, a significant increase found in papilloma and fibropapilloma groups compared to the control group. However, any statistically significant difference found in MDA expression between papilloma and fibropapilloma groups.



**Figure 3.** BPV immune positive reactions in the nucleus of cells (arrows) in the stratum granulosum layer of the epidermis, IHC, Bar = 100 µm (a), Higher magnification, intranuclear BPV expressions (arrowheads), IHC, Bar= 50 µm (b), Normal bovine skin tissue, negative BPV immunoreactivity, IHC, Bar= 50 µm (c), Papilloma, 8-OHdG positive reactions in the cytoplasm and nucleus of the epidermal cells (arrows), IHC, Bar = 100 µm (d), Fibropapilloma, 8-OHdG positive reactions in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts (arrowheads) in the dermis, IHC, Bar = 100 µm (e), Normal bovine skin tissue, negative 8-OHdG immunoreactivity, IHC, Bar= 100 µm (f), Papilloma, membranous (arrows) and cytoplasmic (arrowheads) MDA positive reactions in the of the epidermal cells, IHC, Bar = 100 µm (g), Fibropapilloma, MDA positive reactions in the cytoplasm of fibrocytes and fibroblasts (arrowheads) in the dermis, IHC, Bar = 100 µm (h), Normal bovine skin tissue, negative MDA immunoreactivity, IHC, Bar= 50 µm (i).

**Table 1.** Mean ± SE mean and median values of all groups.

Groups		BPV	8-OHdG	MDA
Control	Mean ± SEM	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
	(Median)	(0)	(0)	(0)
Papilloma	Mean ± SEM	3 ± 0 <sup>b</sup>	2.69 ± 0.12 <sup>c</sup>	1.69 ± 0.18 <sup>b</sup>
	(Median)	(3)	(3)	(3)
Fibropapilloma	Mean ± SEM	3 ± 0 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.13 <sup>b</sup>
	(Median)	(3)	(2)	(1)

a,b,c: Expresses the statistical differences between groups in each column. a-b: P<0.001, a-c: P<0.001, b-c: P=0.004.

### DISCUSSION and CONCLUSION

In accordance with the findings of the literature (Atasever et al. 2005; Özsoy et al. 2011; Carvalho et al. 2013; Hong and Kim 2015; Rojas Anaya et al. 2016; Beytut 2017; Hamad et al. 2017), in this study, a cauliflower-like wart-like growth with or without a stem was detected on the skin of animals with papillomas and fibropapillomas. In cattle, papillomas and fibropapillomas are mostly seen on

the head (Atasever et al. 2005; Özsoy et al. 2011; Hong and Kim 2015), neck (Atasever et al. 2005; Beytut et al. 2017; Timurkan and Alcigir 2017), shoulder (Batista et al. 2013; Hong and Kim 2015; Beytut et al. 2017), abdomen (Hamad et al. 2016; Timurkan and Alcigir 2017) teat (Beytut et al. 2017; Timurkan and Alcigir 2017; Branchi et al. 2020), foot (Rojas-Anaya et al. 2016), vulva (Yamashita-Kawanishi et al. 2019) and penis (Dörttaş and Bilge Dağal 2020) have been reported in various studies. Similar to these data, wart-like growths in various regions such as

head, neck, shoulder, abdomen, breast, foot, vulva and penis were detected in this study.

Hyperkeratosis (Atasever et al. 2005; Hong and Kim 2015; Branci et al. 2020), acanthosis (Özsoy et al. 2011, Araldi et al. 2015; Al-Salihi et al. 2020), rete pegs (Beytut et al. 2017; Hamad et al. 2017; Ata et al. 2018), koilocytosis (Carvalho et al. 2013; Araldi et al. 2014; Hamad et al. 2017), degeneration in keratinocytes (Atasever et al. 2005; Tozato et al. 2013; Timurkan and Alcigir 2017), keratohyaline granules (da Silva et al. 2015; Beytut et al. 2017, Timurkan and Alcigir 2017), dermal proliferation (Grindatto et al. 2015; Hamad et al. 2016; Yamashita-Kawanishi et al. 2019), the histopathological changes observed in papillomas and fibropapillomas were also recorded in this study.

In the immunohistochemical investigations of these cases, which were defined as papilloma and fibropapilloma as a result of macroscopic and microscopic examinations, BPV immune positive reactions were detected in the nucleus of cells in the stratum spinosum layer of the epidermis, as reported in previous studies (Abdouslam et al. 1997; Jelínek and Tachezy 2005; Maeda et al. 2007; Hatama et al. 2009; Tan et al. 2012; Yamashita-Kawanishi et al. 2019).

Free radicals are formed in cells due to endogenous and exogenous factors. Exogenous factors can be briefly summarized as follows; stress, viruses, infectious agents, drug intoxications, ionizing and ultraviolet radiation (Atmaca and Aksoy 2009). ROS, radicals formed from oxygen, lead to the disruption of nucleic acid function by causing mutations or cancer, irreversible DNA damage, changes in enzyme activities, and the formation of new immunological structures by damaging proteins (Tabakoğlu and Durgut 2013). ROS causes the formation of more than 20 oxidative base damage products in DNA and oxidatively modified DNA in the 8-OHdG form is a highly sensitive marker used in determining the amount of DNA damage (Atmaca and Aksoy 2009; Özcan et al. 2015). The most serious pathological process associated with DNA damage is carcinogenesis, and oxidative damage is thought to play an important role in the initiation, progression and promotion phases of carcinogenesis (Özcan et al. 2015). There are studies evaluating 8-OHdG levels in various cancer types such as dysplastic cervical cells infected with human papilloma virus (Romano et al. 2000), squamous cell carcinomas of the head and shoulder (Kumar et al. 2012), recalcitrant warts (Erturan et al. 2019), solid tumors (Qing et al. 2019), breast cancer and endometrial cancer with and without diabetes mellitus (Berstein et al. 2016) and colorectal adenocarcinomas (Płachetka et al. 2013). In these studies, it was determined by the researchers that 8-OHdG expressions increased significantly in tumoral tissues compared to healthy-control groups. In this study, all papilloma and fibropapilloma cases were immune positive in terms of 8-OHdG expressions. A significant increase found in papilloma and fibropapilloma groups compared to the control group. It was concluded that this increase in 8-OHdG expression was seriously related to DNA damage caused by free radicals caused by oncogenic BPVs (Bocanetti et al. 2015).

ROS create lipid peroxidation by especially acting on unsaturated fatty acids in the cell membrane (Tabakoğlu and Durgut 2013). Lipid peroxides formed as a result of lipid peroxidation reactions eventually turn into aldehydes named MDA, 4-hydroxynonenal (HNE) and hexanol, which are secondary or end products (Özcan et al. 2015). It is known that free radicals and lipid peroxidation lead to the

initiation and promotion of carcinogenesis. It has been determined that lipid peroxidation increases in carcinogenic processes and MDA, which is a lipid peroxidation product, has mutagenic and carcinogenic effects by damaging proteins and DNA (Das and Saha 2009; Georgescu et al. 2018). In a study, Sasmaz et al. 2005 found that plasma MDA levels increased in patients with non-genital warts. In a different study Aslan and Saraç, 2011 found a statistically significant increase in plasma MDA level in the bovine group with papillomatosis compared to the healthy control group. In another study, Erturan et al. 2019 detected that compared with the controls, patients with recalcitrant warts had significantly higher levels of MDA. In this study, a significant MDA expression increase found in papilloma and fibropapilloma groups compared to the control group as reported by Aslan and Saraç, 2011. This increase in MDA immune positive expressions was interpreted as the excessive production of free radicals during the formation process of both papilloma and fibropapilloma tumors and these free radicals caused lipid peroxidation.

As a result of the literature review, no study data was found in which DNA damage due to oxidative stress and lipid peroxidation was detected by means of 8-OHdG and MDA expressions in papilloma and fibropapilloma cases of cattle, and it was thought that the findings obtained from this study would contribute to the literature data. Additionally, it has been interpreted that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of papillomas and fibropapillomas.

---

## CONFLICT of INTEREST

The author declares that there is no conflict of interest.

---

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was presented orally and printed as summary text in congress book in 10th National & 1st Veterinary Pathology Congress, 27-31 October 2020, Burdur/Turkey.

---

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: EK  
 Design: EK  
 Supervision / Consultancy: EK  
 Data Collection and / or Processing: EK  
 Analysis and / or Interpretation: EK  
 Literature Review: EK  
 Writing the Article: EK  
 Critical Review: EK

---

## REFERENCES

- Abdouslam OE, Levkut M, Levkutdva M, Revajova V, Ondrejka R, Benisek Z (1997). Immunohistochemistry of the progressive and regressive stages of bovine papillomatosis. *Acta Vet Brno*, 66 (4), 245-248.
- Al-Salihi KA, Al-Dabhawi AH, Ajeel AA, Erzuki IA, Ali TAH (2020). Clinico-histopathological and immunohistochemical study of ruminant's cutaneous papillomavirus in Iraq. *Vet Med Int*, 2020, 5691974.
- Araldi RP, Carvalho RF, Melo TC et al. (2014). Bovine papillomavirus in beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genet Mol Res*, 13 (3), 5644-5653.
- Araldi RP, Melo TC, Neves AC et al. (2015). Hyperproliferative action of bovine papillomavirus: genetic and histopathological aspects. *Genet Mol Res*, 14 (4), 12942-12954.
- Aslan Ö, Saraç Ş (2011). Sığır Papillomatosis'inde lipid peroksidasyon düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8 (2), 75-81.

- Ata EB, Mahmoud MAE, Madboli AA (2018).** Molecular detection and immunopathological examination of Deltapapillomavirus 4 in skin and udder of Egyptian cattle. *Vet World*, 11 (7), 915-920.
- Atasever A, Çam Y, Atalay Ö (2005).** Bir sığır sürüsünde deri papillomatosis olguları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52 (3), 197-200.
- Atmaca E, Aksoy A (2009).** Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU Vet Fak Derg*, 20 (2), 79-83.
- Batista MV, Silva MA, Pontes NE et al. (2013).** Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet J*, 197 (2), 368-373.
- Berstein LM, Poroshina TE, Kovalenko IM, Vasilyev DA (2016).** Serum levels of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine DNA in patients with breast cancer and endometrial cancer with and without diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med*, 161 (4), 547-549.
- Beytut E (2017).** Pathological and immunohistochemical evaluation of skin and teat papillomas in cattle. *Turk J Vet Anim Sci*, 41 (2), 204-212.
- Bianchi RM, Alves CDBT, Schwertz CI et al. (2020).** Molecular and pathological characterization of teat papillomatosis in dairy cows in southern Brazil. *Braz J Microbiol*, 51 (1), 369-375.
- Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Borzacchiello G (2015).** Expression of bcl-2 and p53 in bovine cutaneous fibropapillomas. *Infect Agent Cancer*, 10 (1), 2.
- Carvalho RF, Sakata ST, Giovanni DN et al. (2013).** Bovine papillomavirus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed Res Int*, 2013, 270898.
- da Silva FR, Daudt C, Streck AF et al. (2015).** Genetic characterization of Amazonian bovine papillomavirus reveals the existence of four new putative types. *Virus Genes*, 51 (1), 77-84.
- Das I, Saha T (2009).** Effect of garlic on lipid peroxidation and antioxidation enzymes in DMBA-induced skin carcinoma. *Nutrition*, 25 (4), 459-471.
- Dörttaş SD, Bilge Dağalp S (2020).** Veteriner hekimlikte papillomaviruslar ve önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 15 (1), 91-99.
- Erturan I, Kumbul Doğuç D, Korkmaz S, Büyükbayram HI, Yıldırım M, Kocabey Uzun S (2019).** Evaluation of oxidative stress in patients with recalcitrant warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 33 (10), 1952-1957.
- Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI et al. (2018).** New insights in the pathogenesis of HPV infection and the associated carcinogenic processes: the role of chronic inflammation and oxidative Stress. *J Immunol Res*, 2018, 5315816.
- Grindatto A, Ferraro G, Varello K et al. (2015).** Molecular and histological characterization of bovine papillomavirus in North West Italy. *Vet Microbiol*, 180 (1-2), 113-117.
- Hamad MA, Al-Shammari AM, Odisho SM, Yaseen NY (2016).** Molecular and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus type 1: first report in Iraqi cattle. *Adv Virol*, 2016, 2143024.
- Hamad MA, Al-Shammari AM, Odisho SM, Yaseen NY (2017).** Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and identification of three genotypes in central Iraq. *Intervirology*, 60 (4), 156-164.
- Hatama S, Nishida T, Kadota K, Uchida I, Kanno T (2009).** Bovine papillomavirus type 9 induces epithelial papillomas on the teat skin of heifers. *Vet Microbiol*, 136 (3-4), 347-351.
- Hong YJ, Kim JH (2015).** Detection of bovine papillomaviruses in skin warts of Korean native cattle from Jeju Island. *J Prev Vet Med*, 39 (3), 84-88.
- Jelinek F, Tachezy R (2005).** Cutaneous papillomatosis in cattle. *J Comp Pathol*, 132 (1), 70-81.
- Kumar A, Pant M C, Singh H S, Khandelwal S (2012).** Determinants of oxidative stress and DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck. *Indian J Cancer*, 49 (3), 309-315.
- Maeda Y, Shibahara T, Wada Y et al. (2007).** An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet Microbiol*, 121 (3-4), 242-248.
- Munday JS (2014).** Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Vet Pathol*, 51 (6), 1063-1075.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z (2015).** Oxidative stress and its impact on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Invest*, 6 (3), 331-336.
- Özsoy ŞY, Özyıldız Z, Güzel M (2011).** Clinical, pathological and immunohistochemical findings of bovine cutaneous papillomatosis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 58 (3), 161-165.
- Plachetka A, Adamek B, Strzelczyk JK et al. (2013).** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in colorectal adenocarcinoma--is it a result of oxidative stress? *Med Sci Monit*, 19, 690-695.
- Qing X, Shi D, Lv X, Wang B, Chen S, Shao Z (2019).** Prognostic significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in solid tumors: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 19 (1), 997.
- Rojas-Anaya E, Cantú-Covarrubias A, Álvarez JF, Loza-Rubio E (2016).** Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico. *Can J Vet Res*, 80 (4), 262-268.
- Romano G, Sgambato A, Mancini R et al. (2000).** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis*, 21 (6), 1143-1147.
- Sasmaz S, Arican O, Kurutas EB (2005).** Oxidative stress in patients with nongenital warts. *Mediators Inflamm*, 2005 (4), 233-236.
- Tabakoğlu E, Durgut R (2013).** Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg*, 3 (1), 69-75.
- Tan MT, Yıldırım Y, Sozmen M, et al. (2012).** A histopathological, immunohistochemical and molecular study of cutaneous bovine papillomatosis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (5), 739-744.
- Tozato CC, Lunardi M, Alfieri AF, et al. (2013).** Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. *Braz J Microbiol*, 44 (3), 905-909.
- Timurkan MO, Alcigir E (2017).** Phylogenetic analysis of a partial L1 gene from bovine papillomavirus type 1 isolated from naturally occurring papilloma cases in the northwestern region of Turkey. *Onderstepoort J Vet Res*, 84 (1), e1-e6.
- Yamashita-Kawanishi N, Tsuzuki M, Wei Z, et al. (2019).** Identification of bovine papillomavirus type 1 and 2 from bovine anogenital fibropapillomas. *J Vet Med Sci*, 81 (7), 1000-1005.



## Evaluation of Coagulation Abnormalities and Cardiac Biomarkers in Calves with Naturally Occurring Severe Sepsis or Septic Shock

Amir NASERI<sup>1,\*</sup> Ismail SEN<sup>2</sup> Kursad TURGUT<sup>3</sup> Hasan GUZELBEKTES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Konya, Turkey

<sup>2</sup> Kyrgyz Turkish Manas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan

<sup>3</sup> Near East University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Nicosia, North Cyprus, Turkey

Received: 06.01.2021

Accepted: 10.02.2021

### ABSTRACT

Coagulation abnormalities and myocardial injury frequently occur during sepsis. The aim of the present study was to evaluate the coagulation parameters and cardiac-specific biomarkers at set intervals in septic neonatal calves. Ten healthy calves and 20 septic calves were included in the study. For detecting coagulation parameters prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), D-dimer, fibrinogen, antithrombin III (AT III), thrombocyte and, for cardiac biomarkers cardiac troponin (cTn) I, T, and creatine kinase-MB (CK-MB) were evaluated on admission, 24 and 72 hours later in septic calves and once in healthy calves. The results of coagulation parameters showed a significant elevation of PT and APTT times from the time of admission until the 72nd hour and a significant reduction of AT III and fibrinogen from the time of admission until the 72nd hour. Cardiac troponin T was high in the 72nd hour, and CK-MB was high in the time of admission, 24th and 72nd hours in septic calves compare to the healthy calves. There was a correlation between PT, APTT, fibrinogen with cardiac troponin T. In conclusion, cardiac damage can develop during the hypercoagulable state of disseminated intravascular coagulation (DIC), and maybe it is responsible for the elevation of cTnT and CK-MB and worse outcome in neonatal septic calves.

**Keywords:** Biomarker, Disseminated intravascular coagulation, Myocardium, Sepsis

### ÖZ

## Doğal Gelişen Şiddetli Sepsisli ve Septik Şoklu Buzağlarda Pıhtılaşma Bozuklukları ve Kardiyak Biyomarkırlarının Değerlendirilmesi

Sepsis sırasında pıhtılaşma anormallikleri ve miyokardiyal hasarı sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı septik neonatal buzağlarda pıhtılaşma parametrelerini ve kardiyak spesifik biyobelirteçleri belirlenen aralıklarla değerlendirmektir. 20 adet sepsisli buzağı ve 10 adet sağlıklı buzağı dahil edildi. Pıhtılaşma parametreleri için prothrombin zamanı (PT), aktif edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), D-dimer, fibrinojen, antitrombin III (AT III), trombosit ve kardiyak biyobelirteçler için kardiyak troponin (cTn) I, T ve kreatin kinaz-MB (CK-MB) sepsisli buzağlarda tedavi öncesi, 24. ve 72. saatlerinde iki sefer ve sağlıklı buzağlarda tek sefer olarak değerlendirildi. Pıhtılaşma parametrelerinin sonuçları, PT ve APTT sürelerinde tedavi öncesinden 72. saate kadar önemli bir artış ve AT III ve fibrinojende tedavi öncesinden 72. saate kadar önemli bir azalma belirlendi. Sepsisli buzağlarda kardiyak troponin T ve CK-MB 72 saatte anlamlı olarak yükseldiği tespit edildi. PT, APTT, fibrinojen ile kardiyak troponin T arasında korelasyon olduğu belirlendi. Sonuç olarak, kardiyak hasar, yaygın damar için pıhtılaşmanın (YDP) hiperkoagülasyon aşamasında gelişebilir ve bu durum cTn T ve CK-MB yükselmesine ve prognozun kötü olmasına yol açabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyobelirteçler, Miyokard, Sepsis, Yaygın damar içi pıhtılaşma

### INTRODUCTION

Sepsis is defined as infection-triggered systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and causes high mortality in both human and animals (Martin et al. 2003; Naseri et al. 2019). Coagulation abnormalities frequently occur during sepsis (Anas et al. 2010). In cases with severe sepsis or septic shock, the hemostatic system

disregulation may lead to the clinical or sub-clinical disseminated intravascular coagulation (DIC) microthrombosis formation, global or regional hypoperfusion, multiple organ dysfunctions (MODS), and death (Hardaway et al. 2001). Studies in both companion and farm animals have clearly shown that coagulation abnormalities and DIC can occur during episodes of sepsis and septic shock and might be a significant risk factor for

\*Corresponding author: anaseri@selcuk.edu.tr

This research article was summarized from the first author's PhD thesis.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.



worse outcome (Irmak et al. 2006; Er and Ok 2015). Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), D-dimer, fibrinogen levels, antithrombin III (AT III) and thrombocyte (PLT) are useful in detecting DIC (Caldin et al. 2000).

Additionally, sepsis and septic shock can cause myocardial injury due to abnormalities in coronary perfusion and microcirculation (Mehta et al. 2004). Many factors such as inflammatory mediators, severe oxidative stress, calcium channel dysfunctions, nervous system dysfunction can lead to septic cardiomyopathy (Liu et al. 2017; Naseri et al. 2019; Ince et al. 2019). Studies in the endotoxemia in calves (Peek et al. 2008) and septic foals (Slack et al. 2005) showed that cardiac troponins (cTn) and creatine kinase-MB (CK-MB) are useful biomarkers for detecting cardiac injury during the inflammatory stage. However, there is a paucity of studies which demonstrate coagulation abnormalities and cardiac injury in septic neonatal calves. Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the coagulation parameters, cardiac-specific biomarkers, and possible relationship between these parameters in septic neonatal calves.

## MATERIALS and METHODS

The study protocol was approved by the domestic ethical committee at Selcuk University (No. 2015/04).

### Healthy Calves

A total of 10 healthy Holstein calves from the Faculty Farm were included in the study. Calves were considered to be healthy according to the clinical examination and laboratory analysis findings (Constable et al. 2016).

### Septic Calves

A total of 20 calves with a history of anorexia and diarrhea were selected. Calves included in the study met the criteria for severe sepsis or septic shock (Naseri et al. 2019). Heart rate (HR), body temperature, respiratory rate (RR) and degree of dehydration were evaluated. A standard treatment protocol for septic calves was applied (Naseri et al. 2019).

### Blood Sampling

8 mL blood were obtained by vena jugularis punctation at time of admission, 24th, and 72nd hours for septic calves and once for healthy calves.

5 ml of collected blood transferred into the tubes without anticoagulant and centrifuged at 2000 g for 7 minute and extracted sera were stored at -20 °C. For evaluation of coagulation profile, the rest of 3 mL blood put into the sodium citrate containing tubes and after centrifuge the extracted plasma stored at -20 °C.

### Coagulation Parameters and Cardiac Biomarkers

Coagulation parameters (PT, APTT, D-dimer, AT III and fibrinogen) were measured by coagulometric method (SIEMENS, SYSMEX CA1500, Japan). Platelet counts were measured using a hematology autoanalyzer (MeletSchloesing Laboratories, CFE 279, France). Cardiac troponin I and T were measured by commercial bovine cardiac troponins ELISA kits (Mybiosource, USA). Also, CK-MB was measured by serum biochemistry autoanalyser device (BT3000 plus, Italy).

## Statistical Analysis

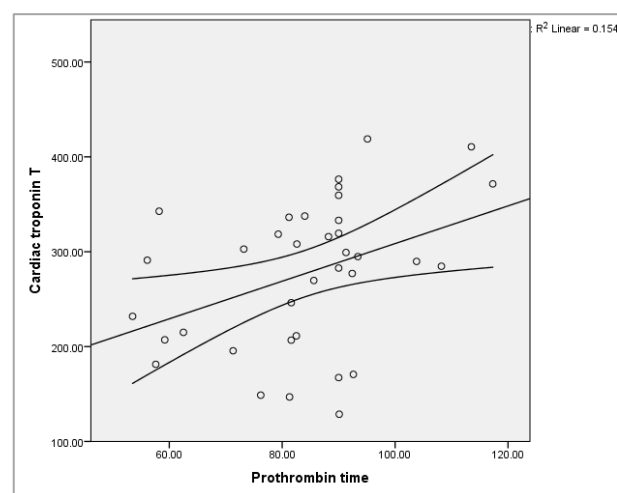
The distribution of the data was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. For comparing the parametric values, ANOVA and Tukey tests were performed. Obtained results were calculated and presented as mean and standard deviation. For comparing the non-parametric values Mann-Whitney U test was performed and presented as median and range. Statistical significance level was taken as 5%. To seek correlations between coagulation parameters and cardiac biomarkers Spearman rank test and linear regression analyzes were used.

## RESULTS

During the clinical examination, the calves were severely dehydrated and in lateral recumbent position. At the time of admission, all septic calves were hypotensive (systolic blood pressure (SBP) <90mmHg or mean arterial pressure (MAP) <65mmHg). Two of 20 calves did not respond to fluid therapy and considered as septic shock. Nineteen calves (19/20, 95%) died during hospitalization period.

The results of coagulation parameters showed a significant elevation of PT and APTT and reduction of AT III and fibrinogen from the time of admission until 72nd hour. The changes of thrombocyte and D-dimer levels were not significant during the study period (Table 1).

Cardiac troponin T were higher in the septic calves at 72 h after admission compare to control calves. Also, the highest levels of CK-MB were established at the time of admission in septic calves in comparison to the healthy calves. The significant difference of CK-MB was observed at 72 h post admission. Although the levels of cTnI were higher in septic calves compare to healthy ones, this difference was not significant (Table 1). The Spearman rank analysis showed a positive correlation between cTnT, PT and APTT and negative correlation between cTnT and fibrinogen levels (Table 2). Linear regression analysis showed positive linear association between cTnT, PT and APTT and negative linear association between cTnT and fibrinogen (Figures 1, 2 and 3).

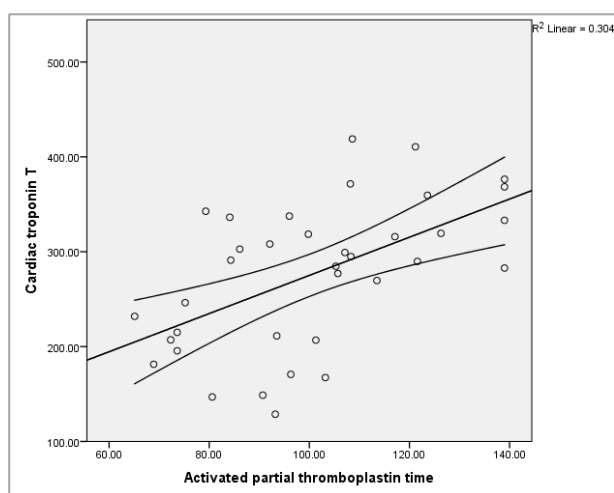
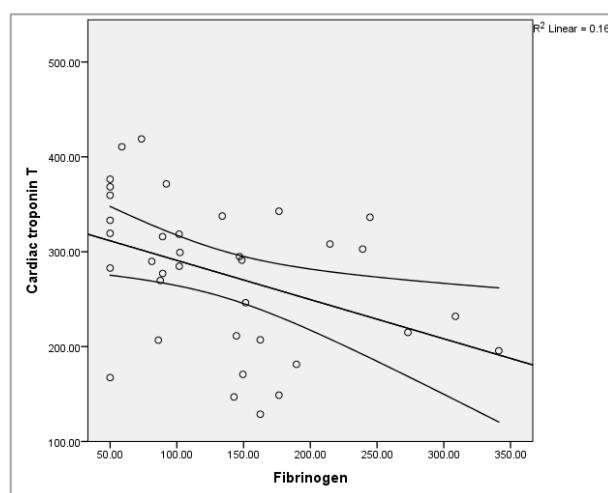


**Figure 1.** Regression analysis showed that there is positive linear correlation between cTnT and PT in septic calves ( $R^2= 0.154$ ,  $P<0.01$ ).

**Table 1.** Comparison of coagulation variables and cardiac biomarkers between healthy and septic calves at set intervals. Data being expressed as mean±SD and median (range in parentheses).

Parameter	Healthy Calves (n:10)	Septic calves (hour(s))		
		0 (n:20)	24 (n:17)	72 (n:12)
PT (sec)	68.53±10.42	72.81±13.76	84.23±13.24 <sup>ab</sup>	94.90±10.77 <sup>abc</sup>
APTT (sec)	83.73±12.32	86.73±13.94	96.60±14.88	119.30±20.19 <sup>abc</sup>
Fibrinogen (mg/mL)	280.38±90.17	193.38±76.10 <sup>a</sup>	134.77±60.81 <sup>ab</sup>	73.59±38.54 <sup>abc</sup>
D-dimer (µg/mL)	0.15±0.02	0.14±0.02	0.16±0.01	0.15±0.02
AT III (%)	52.42±8.67	48.64±15.52	36.24±15.62 <sup>ab</sup>	27.06±16.4 <sup>ab</sup>
PLT (m/mm <sup>3</sup> )	390.40±195.13	406.83±236.60	406.75±274.79	342.91±188.23
cTnT (ng/ml)	222.60±89.47	262.86±65.64	259.70±82.78	307.98±79.6 <sup>a</sup>
cTnI (ng/ml)	12.80 (2.80-232.80)	50.50 (3.40-472.10)	33.10 (6.20-359.20)	51.40 (3.40-163.30)
CK-MB (IU/L)	72.5 (29.9-110.9)	176.1 <sup>a</sup> (12-2228)	149.2 <sup>a</sup> (44.6-838.4)	92.00 <sup>ab</sup> (51.60-1513.30)

<sup>a</sup> comparison between healthy calves ( $P<0.05$ ), <sup>b</sup> comparison between time of admission ( $P<0.05$ ), <sup>c</sup> comparison between 24<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hours ( $P<0.05$ ), PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; AT III, antithrombin III; cTn I, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; CK-MB, creatine kinase-MB.

**Figure 2.** Regression analysis showed that there is positive linear correlation between cTnT and APTT in septic calves ( $R^2= 0.304$ ,  $P<0.01$ ).**Figure 3.** Regression analysis showed that there is negative linear correlation between cTnT and fibrinogen in septic calves ( $R^2= 0.168$ ,  $P<0.05$ ).**Table 2.** Spearman correlation coefficients of coagulation variables and cardiac biomarkers in 20 septic calves.

Variable	CTnT	CTnI	CK-MB
PT	0.381**	0.292	-0.163
APTT	0.447**	0.118	-0.030
Fibrinogen	-0.375*	-0.076	0.063
D-dimer	-0.029	0.113	-0.065
AT III	-0.059	-0.171	-0.080
PLT	0.226	0.169	-0.126

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; AT III, antithrombin III; cTn I, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; CK-MB, creatine kinase-MB.

## DISCUSSION and CONCLUSION

Traditionally, it is suggested that evaluating PLT count, PT, APTT, and AT III, fibrinogen, fibrin degradation products, D-dimer levels, and schistocytes are useful laboratory tests for detecting DIC (Turgut 2000). However, Wada and his colleagues stated that hemostatic system dysfunction and imbalance between hypercoagulation and hyperfibrinolysis state led to the DIC in patients with sepsis. In septic patients hypercoagulation state is remarkable and can lead to the MODS (Wada et al. 2014). Accordingly, the septic calves can be classified as hypercoagulation predominance type DIC. In sepsis initiation of coagulation is tightly dependent to the epithelium activation. This hypercoagulation predominance type of DIC can lead to microthrombi formation, ischemia, and MODS (Kenney et al. 2010; Taylor 2015).

In the results of the present study, the coagulation parameters showed a significant elevation of PT and APTT, and a significant reduction of AT III and fibrinogen. Different studies in diarrhetic calves demonstrated that because of the presence of sepsis or septic shock in neonatal calves, the most common findings were the prolongation of PT and APTT (Irmak et al. 2006; Gökçe et al. 2006; Sobiech et al. 2013). It is accepted that at least 25% prolongation in PT or APTT is necessary for making the decision of consumption of coagulation factors for hypercoagulation (de Laforcade et al. 2003). For this reason, when we evaluate the results of PT and APTT in our study, the prolongation of PT and APTT was meaningful at 72 h post admission. This shows that excessive consumption of clotting factors at 72 h of admission have been developed due to the severity of the disease. AT III deals with hemostatic disorders. Previous studies in animals also showed that AT III activity in inflammatory diseases has reduced and may be indicative of changes in the hypercoagulability state (Barton et al. 1998; de Laforcade et al. 2003). Levi (2013) determined that hypofibrinogenemia is one of the findings of coagulation abnormalities in human DIC. Hypofibrinogenemia is an uncommon manifestation of DIC in large animals (Morris 1996) and, may suggest the hypercoagulation and concomitant liver dysfunction in septic calves. All these results show us that hypercoagulation is remarkable and dominant (hypercoagulation predominance type of DIC) and organ failure was the main symptom observed in the calves with sepsis (Kenney et al. 2010; Taylor 2015). However, there was no significant change in the levels of thrombocyte and D-dimer in the present study period. These results showed that hyperfibrinolysis was not remarkable (no hyperfibrinolysis predominance type of DIC) in the calves with sepsis.

Echocardiographic studies in septic calves showed that severe cardiovascular compromise had developed as a result of sepsis and septic shock in calves (Mehta et al. 2004; Erturk et al. 2018; Naseri et al. 2018; Naseri et al. 2019). There is no data available with regards to cardiac biomarkers in naturally occurring neonatal calves' septicemia. In the present study, cTnT was high in 72nd hour, and CK-MB were high in time of admission, 24th and 72nd hours in septic calves compare to the healthy calves. Cardiac troponins are regulatory proteins of the actin filaments of the myocardium (Ammann et al. 2004). Cardiac troponin I and T are released in consequence of myocardial cell damage (Wong and White 2005). Previous studies in ruminants demonstrated that variety of diseases such as monensin intoxication (Varga et al. 2009), traumatic reticulopericarditis (Gunes et al. 2008), ventricular tachycardia (Naseri et al. 2017), and endotoxemia (Peek et al. 2008) can lead to cardiac injury and the elevation of cardiac troponins, especially cTnI. Aydogdu and his colleagues informed that the blood serum concentrations of cTnT and CK-MB (not cTnI) were significantly higher in neonatal calves with respiratory distress syndrome compare to healthy calves (Aydogdu et al. 2016). Thus, the elevation of cTnT and CK-MB in the calves with sepsis may indicate that acute cardiac injury, because of abnormalities in coronary perfusion and microcirculation, is a part of MODS observed in calves with sepsis, due to hypercoagulation predominance type of DIC. This could also be supported with the correlation and linear association between PT, APTT and fibrinogen levels with cTnT.

The findings of the present study showed that cardiac damage can develop during the hypercoagulable state of DIC because of prolongation of APTT and PT, reduction in AT III activity and decrease in fibrinogen concentration, and is also responsible for the elevation of cTnT and CK-MB and poor outcome in neonatal septic calves.

## CONFLICTS of INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project number: 1130218). Presented, in part in abstract form, at the IV International Academic Research Congress (INES) Congress, Antalya, Turkey in 2018.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: AN, IS

Design: IS, KT

Supervision / Consultancy: IS, KT, HG

Data Collection and / or Processing: AN

Analysis and / or Interpretation: AN, KT

Literature Review: AN

Writing the Article: AN, IS, KT, HG

Critical Review: AN, IS, KT, HG

## REFERENCES

- Ammann P, Pfisterer M, Fehr T, Rickli H (2004). Raised cardiac troponins. *Br Med J*, 328, 1028-1029.
- Anas AA, Wiersinga WJ, de Vos AF, van der Poll T (2010). Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *Neth J Med*, 68, 147e52.
- Aydogdu U, Yildiz R, Guzelbektes H, Coskun A, Sen I (2016). Cardiac biomarkers in premature calves with respiratory distress syndrome. *Acta Vet Hung*, 64, 38-46.
- Barton MH, Morris DD, Norton N, Prasse KW (1998). Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*, 12, 26-35.
- Caldin M, Furlanello T, Lubas G (2000). Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet Clin Pathol*, 29, 51-54.
- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W (2016). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses*, 11th edition, St. Louis, MO.
- de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE (2003). Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med*, 17, 674-679.
- Er C, Ok M (2015). Levels of cardiac biomarkers and coagulation profiles in dogs with parvoviral enteritis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 383-388.
- Erturk A, Durgut MK, Naseri A, Ok M (2018). Echocardiography, Ultrasonography and Laboratory Findings of Left Ventricular Systolic Dysfunction and Right-Sided Congestive Heart Failure in A Neonatal Calf. *CDVS*, 1, 145-149.
- Gökçe G, Gökçe Hİ, Erdoğan HM, Güneş V, Citil M (2006). Investigation of the coagulation profile in calves with neonatal diarrhoea. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 223-227.
- Gunes V, Atalan G, Citil M, Erdogan HM (2008). Use of cardiac troponin kits for the qualitative determination of myocardial cell damage due to traumatic reticuloperitonitis in cattle. *Vet Rec*, 162, 514-517.
- Hardaway RM, Williams CH, Vasquez Y (2001). Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Semin Thromb Hemost*, 27, 577e83.
- Ince ME, Turgut K, Akar A, Naseri A, Sen I, Süleymanoglu H, Ertan M, Sagmanligil V (2019). Prognostic importance of tissue Doppler imaging of systolic and diastolic functions in dogs with severe sepsis and septic shock. *Acta Vet Hung*, 67, 517-528.
- Irmak K, Sen I, Cöl R, Birdane FM, Güzelbektes H, Civelek T, Yılmaz A, Turgut K (2006). The evaluation of coagulation profiles in calves with suspected septic shock. *Vet Res Commun*, 30, 497-503.

- Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, deLaforcade-Buress AM, Berg JR, Silverstein DC, Montealegre CD, Jutkowitz LA, Adamantos S, Ovbey DH, Boysen SR, Shaw SP (2010).** Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *J Am Vet Med Assoc*, 236, 83-87.
- Levi M (2013).** Pathogenesis and management of peripartum coagulopathic calamities (disseminated intravascular coagulation and amniotic fluid metabolism). *Thromb Res*, 131, S32-S34.
- Liu YC, Yu MM, Shou ST, Chai YF (2017).** Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments. *Front Immunol*, 8, 1021.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003).** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348, 1546e54.
- Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR (2004).** Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int J Cardiol*, 95, 13-17.
- Morris DD (1996).** Alterations in clotting profile. In: Large Animal Internal Medicine. Smith BP. Ed. Mosby, Missouri, USA.
- Naseri A, Ider M, Ok M (2017).** Sustained polymorphic ventricular tachycardia in a calf. *Eurasian J Vet Sci*, 33, 130-132.
- Naseri A, Sen I, Turgut K, Guzelbektes H, Constable PD (2019).** Echocardiographic assessment of left ventricular systolic function in neonatal calves with naturally occurring sepsis or septic shock due to diarrhea. *Res Vet Sci*, 126, 103-112.
- Naseri A, Turgut K, Sen I, Ider M, Akar A (2018).** Myocardial depression in a calf with septic shock. *Vet Rec Case Rep*, 6, e000513.
- Peek SF, Apple FS, Murakami MA, Crump PM, Semrad SD (2008).** Cardiac isoenzymes in healthy Holstein calves and calves with experimentally induced endotoxemia. *Can J Vet Res*, 72, 356.
- Slack JA, McGuiirk SM, Erb HN, Lien L, Coombs D, Semrad SD, Riseberg A, Marques F, Darien B, Fallon L, Burns P (2005).** Biochemical markers of cardiac injury in normal, surviving septic, or nonsurviving septic neonatal foals. *J Vet Intern Med*, 19, 577-580.
- Sobiech P, Rękawek W, Ali M, Targoński R, Żarczyńska K, Snarska A, Stopyra A (2013).** Changes in blood acid-base balance parameters and coagulation profile during diarrhea in calves. *Pol J Vet*, 16, 543-549.
- Taylor S (2015).** A review of equine sepsis. *Equine Vet Educ*, 27, 99-109.
- Turgut K (2000).** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. 2. baskı. Konya, Bahçivanlar Basım San AŞ.
- Varga A, Schober KE, Holloman CH, Stromberg PC, Lakritz J, Rings DM (2009).** Correlation of serum cardiac troponin I and myocardial damage in cattle with monensin toxicosis. *J Vet Intern Med*, 23, 1108-1116.
- Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y (2014).** Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care Med*, 2, 15.
- Wong CK, White HD (2005).** Implications of the new definition of myocardial infarction. *Postgrad Med J*, 81, 552-5.



## Comparative Studies on the Treatment and Incidence of Footrot in Sheep in Muş and Its Region

Ferit YILDIZ<sup>1</sup>,\* Musa GENÇÇELEP<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ministry of Agriculture and Forestry, Provincial Directorate of Muş, 49100, Muş, Turkey

<sup>2</sup> University of Van Yuzuncu Yil, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 65040, Van, Turkey

Received: 31.01.2021

Accepted: 01.03.2021

### ABSTRACT

In the present study, in 2016-2017 years, a total of 10604 animals including 6031 Morkaraman and 4573 Akkaraman sheep were examined. It was determined that 969 of them had footrot disease and the disease was present in flocks with a rate of 9.14%. According to race-age-sex, percentage calculations were done. It was observed that Morkaraman sheep were more resistant to footrot compared to Akkaraman sheep (%8.47<%10.02) according to the race base. Ca, P, Zn and Cu elements and their amounts were correlated with each other in the blood serums of the diseased and healthy animals and depending on the disease it was recorded that there was an increase in the value of copper, but a decrease in the value of zinc. In this study, animals were divided into five groups to compare the effects of treatments. The group I was treated with Ceftiofur+Flunixin-meglumine, the group II with 10% copper sulphate (CuSO<sub>4</sub>)+Flunixin-meglumine, the group III with only 10% CuSO<sub>4</sub> while the group IV was the control group having no treatment. On the other hand, Group V was given vaccination. Whereas the best treatment was provided in group I (90%); the recovery rate was 60% in the group II and 20% in the group III. An improvement of 10% was achieved in the group IV without treatment. Therefore, it can be inferred that the foot bathing of 10% CuSO<sub>4</sub> isn't enough to treat the disease considering the labor, time and expenses. The treatment must be continued with an antibiotic agent. The efficiency of a parenteral Ceftiofur active antibiotic which doesn't pass into milk, with an anti-inflammatory Flunixin-meglumine on treating the disease in a short time is thought to benefit the breeders in many ways in the treatment of the footrot due to easy access to the medicine and application of it by the breeders with peace of mind. In Group V, successful results were obtained from vaccine application. However, application of 10% CuSO<sub>4</sub> could be considered as a preventive measure for the prevention of the disease.

**Keywords:** Foot diseases, Footrot, Incidence, Sheep, Treatment

### öz

## Muş ve Yöresinde Koyun Piyeteninin İnsidansı ve Sağaltımı Üzerine Karşılaştırmalı Çalışmalar

Sunulan çalışmada 2016-2017 yıllarında sahada 6031 baş Morkaraman ve 4573 baş Akkaraman ırkı koyun olmak üzere toplam 10604 hayvan incelenmiştir. Bunların 969'unun piyetenli olduğu, dolayısıyla %9.14'lük bir oranla hastalığın sürülerde bulunduğu saptanmıştır. İrk-yaş-cinsiyete göre piyetenin yüzde hesaplamaları yapılmış olup, ırk bazında yüzde oranlar değerlendirildiğinde Morkaramanların Akkaramanlara oranla piyetenine daha dayanıklı oldukları görülmüştür (%8.47<%10.02). Piyetenli ve sağlıklı hayvanların kan serumlarında Ca, P, Zn ve Cu elementlerinin miktarları ve birbirleriyle korelasyonu yapılmış ve hastalığa bağlı olarak piyetenlilerde bakır değerinde yükselme buna karşın çinko değerinde azalma görülmüştür. Çalışmada sağaltım karşılaştırmaları için hayvanlar beş gruba ayrılarak I. gruba Ceftiofur+Fluniksine-meglumin, II. gruba %10'luk bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>)+Fluniksine-meglumin, III. gruba sadece %10'luk CuSO<sub>4</sub> uygulanmıştır. IV. grup kontrol grubu olup herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. V. gruba ise aşı uygulaması yapılmıştır. Çalışmada en iyi tedavi I. grupta sağlanırken (%90), II. grupta %60, III. grupta %20, IV. grupta tedavi yapılmaksızın %10'luk bir iyileşme sağlanmıştır. Dolayısıyla %10'luk CuSO<sub>4</sub> ayak banyosunun harcanan emek, zaman ve masraflar göz önüne alındığında hastalığı tedavi etmede yeterli olmadığı, mutlaka antibiyotik bir ajanla tedavinin sürdürülmesi gerektiği anlaşılmıştır. Sütte geçmeyen Ceftiofur etken maddeli parenteral bir antibiyotik ile yangı giderici Fluniksine-meglumin kullanıldığında hastalığı kısa sürede tedavi etme yetkinliği, yetiştiriciler tarafından kolay temin edilebilir ve gönül rahatlığıyla uygulanabilir olması sebebiyle piyetenin tedavisinde yetiştiricilere birçok yönden fayda sağlayacağı kanaati oluşmuştur. V. grupta hastalıktan korunmak amacıyla aşı uygulamasından başarılı sonuçlar alınmıştır. Bununla beraber %10'luk CuSO<sub>4</sub> uygulanmasının hastalıktan korunmada önleyici bir tedbir olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ayak hastalıkları, İnsidans, Koyun, Piyeten, Tedavi



## GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede koyunların en sık rastlanan ayak hastalığı piyeten olarak kabul edilir. Piyetenin ayak hastalıkları arasında birçok ülkede hep ilk sırada olmasının nedeni, bulaşıcı bir enfeksiyon olmasının yanında önemli sayılabilecek verim kayıplarına yol açmasıdır (Alkan 1998; Sağlıyan ve ark. 2003; Sertkaya ve Şındak 2004). Piyeten daha çok ılıman iklim hastalığı olup etkenlerin sağlıklı hayvanlara bulaşması için ılık ve nemli çevre koşulları gerekmektedir (Alkan 1998; Avki ve ark. 2004).

Piyeten interdigital deri, corium unguiae ve diğer dokularda yangı ve nekroz oluşumu ile karakterizedir. Hastalık, capsula unguiae'nin değişik düzeylerde canlı tırnaktan ayrılması ve corium unguiae'nin nekrozu ile karakterizedir (Yavru ve ark. 1989; İzci ve ark. 1994; Alkan 1998). Hastalık çoğunlukla ön ayaklara yerleşir. Özellikle ilkbaharda nisanın haziran ve sonbaharda eylülün ekime kadar olan dönemde görülür (Yavru ve ark. 1989; İzci ve ark. 1994; Bagley 1998; Sağlıyan ve ark. 2003; Sertkaya ve Şındak 2004).

Bu çalışma planlanırken yapılan ön araştırmada Muş'ta özellikle küçükbaşların en önemli ayak hastalığı olan piyetenin sık sık görüldüğü ancak tedavisinin yetiştiriciler tarafından iyi bilinmediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile; Muş ili ve yöresindeki koyunlarda piyetenin insidansının belirlenmesi, kan serumlarındaki Ca, P, Zn ve Cu elementlerinin hastalığın oluşumundaki etkisi ve hastalıktan korunmada aşı uygulamasının etkili olup olmadığının tespiti ile farklı tedavi seçeneklerinin başarı durumları karşılaştırılmıştır. Böylece yetiştiricilerin bu hastalığı daha iyi tanıyıp, hastalığa karşı önlem almaları sağlanacak, minimum zarar maksimum fayda sağlayacak yöntem ve gereçlerle hayvan sağlığı, hayvan refahı, gıda güvenliği ve halk sağlığı gözetilerek yetiştiricilerin üretimlerine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvan Materyali

Muş ve yöresinde 14 farklı yerleşim yerindeki toplam 47 koyun sürüsünden 10604 baş koyun hayvan materyalimizi oluşturmaktadır. Çalışmaya dâhil olan sürülerdeki piyetenli ve sağlıklı hayvanların sayıları, oranları, yerleşim yeri, ırk-yaş-cinsiyet dağılım tabloları hazırlanarak hastalığın insidansı belirlenmiştir. Çalışmada 40 baş piyetenli koyunla tedavi grupları oluşturulmuş, 230 baş koyuna aşı uygulaması yapılmış ve 20 baş sağlıklı koyun ile 20 baş piyetenli koyundan da kan numunesi alınarak iz element tahlilleri yapılmıştır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının 12.12.2017 tarih ve E.3150874 sayılı yazısı ile çalışmanın etik kurul onay belgesine gerek olmadığı belirtilmiştir.

### Metot

Çalışmaya dâhil olan koyunlar mera öncesi dönemde (nisan-mayıs-haziran aylarında) ve mera sonrası dönemde (eylül-ekim-kasım aylarında) piyeten hastalığı yönünden alınan anamnez ve klinik muayeneler sonucunda belirlenmiştir. Bu çalışmada hayvanlar beş gruba ayrılmıştır (grup I, II, III, IV ve V). İlk dört grubun hayvanları piyetenli 40 baş koyunun her grupta 10' ar adet olacak şekilde eşit paylaşımı yapılarak oluşturulmuştur. Seçilen hayvanların sürü içerisinde kolaylıkla bulunabilmesi için baş, sırt ve kuyruk kısımları farklı renklerde boyanmıştır. V. grubu oluşturan 230 hayvana ise sadece aşı uygulaması yapılmıştır.

Topallığın sınıflandırmasında Samsar ve ark. (1996) tarafından aşağıda ifade edilen sınıflandırma kullanılmıştır.

Hafif Derecede Topallık: Topallık belli belirsizdir.

Orta Derecede Topallık: Dururken pek dikkati çeken bir anormallik bulunmayıp, yürüyüşte ve tırıs koşturmada az çok belirgin bir fonksiyon bozukluğu görülür.

Şiddetli (ileri) Derecede Topallık: Hayvan hasta ayağı üzerine hiç basamaz veya bu ayak yerde sürünür. Hareket daha çok üç bacak üzerinde ve sekerek yapılır.

Gruplara aşağıda belirtilen tedaviler uygulanarak kontrolleri yapılmış ve sonuçları tablolara işlenmiştir.

I. grup: Ceftiofur (1 ml'de 50 mg ceftiofura eşdeğer ceftiofurhidroklorid -1mg/kg dozda sc yolla 24 saat arayla 2 uygulama) + Fluniksin-meglumin (1 ml'de 50 mg Fluniksin-meglumin- 2.5 mg/kg dozda im. yolla 24 saat arayla 2 uygulama) uygulanmıştır. İlk uygulamadan sonra her gün kontrolleri yapılarak sonuçları Tablo 1'e işlenmiştir.

II. grup: %10'luk CuSO<sub>4</sub> (3-5 dk ayak banyosu 24 saat arayla 4 uygulama) + Fluniksin-meglumin (1 ml'de 50 mg Fluniksin-meglumin-2.5 mg/kg dozda im. yolla 24 saat arayla 2 uygulama) uygulanmıştır. İlk uygulamadan sonra her gün kontrolleri yapılarak sonuçları Tablo 2'ye işlenmiştir.

III. grup: Sadece %10'luk CuSO<sub>4</sub> (3-5 dk ayak banyosu 24 saat arayla 4 uygulama) uygulanmıştır. İlk uygulamadan sonra her gün kontrolleri yapılarak sonuçları Tablo 3'e işlenmiştir.

IV. grup: Kontrol grubu olup herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Bu grubun da her gün kontrolleri yapılarak sonuçları Tablo 4'e işlenmiştir.

V. grup: Aşı uygulanan 230 baş koyundan oluşan gruptur. Koyunların kulağının 5-7 cm gerisinden boyuna derialtı yolla 1 ml aşı enjeksiyonu yapılarak, 4-6 hafta sonra rapel uygulaması ve altı ay sonra üçüncü bir uygulama yapılmış olup, yıl boyunca hayvanlar 2-3 hafta arayla kontrol edilmiştir.

Gruplara yukarıda belirtilen tedaviler uygulanarak her 24 saatte bir topallığın geçip geçmediği ve hastalığın iyileşme süreci kontrol edilmiştir. Topallık devam ediyorsa hafif-orta-şiddetli şeklinde sınıflamaları yapılarak 96 saatin sonundaki durumu da değerlendirilmiş ve tablolara işlenmiştir (Tablo 1-4).

### Kan Örneklerinin Analizi

Piyetenli ve sağlıklı 20'şer hayvanın kan serumlarının analizleri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır. Cu ve Zn düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spectrofotometresi (AA7000-Shimadzu, Kyoto, Japan) ile Ca ve P düzeyleri ise Abbott Architect (C8000 seri model) cihazlarla çalışılmıştır. Kandaki Ca, P, Zn ve Cu miktarlarının hastalıklı ve sağlam hayvanlardaki değerleri Tablo 5'e işlenmiştir.

### Histopatolojik Analiz

Hastalığın histopatolojisini ve hangi dokulara kadar ulaştığını tespit etmek amacıyla piyetenli ayak numuneleri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim dalı laboratuvarında incelendi. Makroskopik incelemesi sonrasında özellikle interdigital bölgede ülseratif dermatitis belirlenen kısımlarından doku örnekleri alındı. Doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin takip işlemleri yapılarak parafin bloklara gömülmüş ve mikrotomla 5 µm' lik kesitler alınarak histopatolojik incelemeler için hematoksilen eozin ile boyanmıştır.

**Tablo 1.** I. grup, Ceftiofur+Fluniksın-meglumin uygulanmış grupta topallık derecelendirmesi.**Table 1.** Group I, lameness scores in the Ceftiofur+Flunixin-meglumine treated group.

Sıra	Küpe no: TR49	Cinsiyet	İrk	Yaş	Topallayan ayak	Topallık derecesi				
						Uyg öncesi	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1	2157060	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sol	Şiddetli	Orta	Hafif	Hafif	Hafif
2	1573019	Dişi	Morkaraman	5 Yıl	Arka sol	Şiddetli	Hafif	Yok	Yok	Yok
3	1573067	Dişi	Akkaraman	5 Yıl	Ön sol	Şiddetli	Yok	Yok	Yok	Yok
4	1573074	Dişi	Morkaraman	4 Yıl	Arka sol	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
5	2155487	Dişi	Akkaraman	1 Yıl	Ön sağ	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
6	2157028	Dişi	Akkaraman	3 Yıl	Ön sağ	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
7	2157068	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	İki ön	Şiddetli	Yok	Yok	Yok	Yok
8	1573218	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Orta	Hafif	Yok	Yok	Yok
9	1318135	Dişi	Akkaraman	2 Yıl	İki ön	Şiddetli	Yok	Yok	Yok	Yok
10	1318085	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok

**Tablo 2.** II. grup, %10'luk CuSO<sub>4</sub>+Fluniksın-meglumin uygulanmış grupta topallık derecelendirmesi.**Table 2.** Group II, lameness scores in the 10% CuSO<sub>4</sub>+Flunixin-meglumine treated group.

Sıra	Küpe no: TR49	Cinsiyet	İrk	Yaş	Topallayan ayak	Topallık derecesi				
						Uyg öncesi	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1	2157024	Dişi	Morkaraman	1 Yıl	Ön sağ	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
2	Küpesiz	Erkek	Morkaraman	4 Ay	İki ön	Şiddetli	Yok	Yok	Yok	Yok
3	Küpesiz	Erkek	Morkaraman	4 Ay	Ön sol	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Hafif	Hafif
4	2155495	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
5	Küpesiz	Erkek	Morkaraman	1 Yıl	Arka sol	Orta	Yok	Yok	Hafif	Hafif
6	1573158	Dişi	Morkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Şiddetli	Hafif	Hafif	Yok	Yok
7	Küpesiz	Dişi	Morkaraman	4 Ay	Ön sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Yok	Yok
8	Küpesiz	Dişi	Morkaraman	4 Ay	İki ön	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
9	Küpesiz	Erkek	Akkaraman	2 Yıl	Ön sağ	Şiddetli	Şiddetli	Yok	Şiddetli	Şiddetli
10	Küpesiz	Erkek	Akkaraman	2 Yıl	Arka sol	Orta	Orta	Yok	Yok	Yok

**Tablo 3.** III. grup, sadece %10'luk CuSO<sub>4</sub> uygulanmış grupta topallık derecelendirmesi.**Table 3.** Group III, lameness scores in the only 10% CuSO<sub>4</sub> treated group.

Sıra	Küpe no: TR49	Cinsiyet	İrk	Yaş	Topallayan ayak	Topallık derecesi				
						Uyg öncesi	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1	2155423	Dişi	Akkaraman	5 Yıl	Ön sağ	Orta	Orta	Hafif	Hafif	Hafif
2	2155386	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
3	2155407	Dişi	Akkaraman	5 Yıl	Arka sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
4	1678810	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
5	1392980	Dişi	Morkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
6	2155458	Dişi	Akkaraman	1,5 Yıl	Arka sol	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
7	2155406	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Hafif	Hafif
8	2155409	Dişi	Akkaraman	3 Yıl	Arka sağ	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
9	2155389	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	İki arka	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Yok	Yok
10	1678769	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Orta	Hafif	Yok	Yok	Yok

**Tablo 4.** IV. grup, kontrol grubu topallık derecelendirmesi.**Table 4.** Group IV, lameness scores in the control group.

Sıra	Küpe no: TR49	Cinsiyet	İrk	Yaş	Topallayan ayak	Topallık derecesi				
						Uyg öncesi	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1	2155423	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sağ	Şiddetli	Yok	Yok	Şiddetli	Şiddetli
2	2155435	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
3	1980994	Dişi	Akkaraman	3 Yıl	Arka sağ	Orta	Yok	Orta	Orta	Orta
4	2155242	Dişi	Morkaraman	4 Yıl	Ön sol	Orta	Orta	Orta	Hafif	Hafif
5	2155457	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Orta	Orta	Orta	Hafif	Hafif
6	2155399	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sol	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
7	561713650	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Orta	Orta	Yok	Hafif	Hafif
8	2155430	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Ön sol	Orta	Yok	Yok	Yok	Yok
9	2155225	Dişi	Akkaraman	5 Yıl	Ön sağ	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
10	2155422	Dişi	Akkaraman	4 Yıl	Arka sağ	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli

**Tablo 5.** Piyetenli ve sağlıklı koyunların kan serumu eser element analiz sonuçları.**Table 5.** Trace element analysis results in blood serum of the healthy sheep and sheep with footrot.

Numune Adı *	Bakır (Cu) (mg/L)	Çinko (Zn) (mg/L)	Kalsiyum (Ca) (mg/dl)	Fosfor (P) (mg/dl)	Numune Adı *	Bakır (Cu) (mg/L)	Çinko (Zn) (mg/L)	Kalsiyum (Ca) (mg/dl)	Fosfor (P) (mg/dl)
S1	4.6773	1.6279	11.6	6.6	P1	4.5622	1.6683	10.3	6.1
S2	4.0441	1.3256	11.0	6.6	P2	4.9755	1.0369	10.0	5.0
S3	5.1665	0.9802	9.9	6.6	P3	5.1050	1.1583	9.7	4.8
S4	4.6485	1.3796	10.0	6.5	P4	4.4614	1.3121	9.6	5.5
S5	4.9866	1.7061	9.1	6.1	P5	5.1953	1.0639	9.8	4.5
S6	4.4327	1.5118	10.2	6.3	P6	4.8787	0.9586	10.1	4.9
S7	4.3175	1.5658	11.7	6.7	P7	4.5765	0.8048	10.1	3.9
S8	4.2312	1.3769	8.8	7.6	P8	4.9939	1.6213	9.5	5.2
S9	4.6053	1.7520	10.0	7.0	P9	4.7565	1.4066	9.5	5.5
S10	5.5263	1.7439	10.3	5.0	P10	4.7924	1.2150	9.7	5.5
S11	4.9795	1.2797	9.0	7.0	P11	5.0370	1.3553	9.7	4.5
S12	4.3751	1.4309	8.1	5.5	P12	5.1809	1.3094	10.4	6.5
S13	4.1449	1.5037	10.0	5.8	P13	5.4255	1.1988	9.3	6.3
S14	4.3751	1.7358	9.3	6.5	P14	5.6414	1.2150	9.9	6.1
S15	4.2024	1.5874	10.4	4.8	P15	5.3104	0.9262	9.1	4.8
S16	4.2456	1.5805	9.9	6.6	P16	5.4543	1.0261	9.1	5.4
S17	5.2529	1.6791	8.6	5.6	P17	5.5694	1.1988	9.7	4.6
S18	4.3751	1.9355	9.6	4.3	P18	4.9795	1.1718	9.2	7.0
S19	4.8356	1.5199	9.2	7.0	P19	5.2529	0.9856	8.8	6.1
S20	4.1161	1.1124	11.1	6.6	P20	5.1521	1.2582	10.0	5.7

\*S: Sağlıklı hayvanlardan alınan kan serumu numunesi, P: Piyetenli hayvanlardan alınan kan serumu numunesi.



### İstatistiksel Analizler

Çalışmanın aynı zamanda bir insidans araştırması olması sebebiyle saha ve sürü taramasının başlangıcından itibaren elde edilen bütün verilerin istatistiki değerlendirilmesi yapılmıştır. Ayrıca kandaki Ca, P, Zn ve Cu miktarlarının hastalıklı ve sağlam hayvanlardaki değerleri karşılaştırılarak istatistiki olarak önemli olup olmadığı tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz olarak sayısal ve yüzde hesaplamaların yanı sıra SPSS paket programı ile t-testi ve korelasyon analizi yapılmıştır. İstatistik önem değeri  $P < 0.05$  olarak alınmıştır.

### BULGULAR

Sunulan çalışmada; sahada toplam 10604 hayvandan 6031 baş Morkaraman, 4573 baş Akkaraman ırkı koyunlar incelenmiş olup, bunlardan 969 baş hayvanın piyetenli olduğu ve bunun 927 başının dişi ve 42 başının erkek olduğu saptanmıştır. Lezyonlara bağlı olarak hayvanlarda hafif, orta ve ileri derecelerde topallıklar gözlenmiştir. Lezyon nedeniyle ayakta durmakta güçlük çeken koyunların karpal eklem üzerine durarak otladıkları belirlenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Ön ayaklarında piyeten olduğu için karpal eklem üzerine duran ve otlayan koyun.

**Figure 1.** Sheep standing and grazing on the carpal joint due to footrot on the front legs.

Hastalıklı ayaklarda yapılan fiziksel muayene sırasında tırnak arası deride değişik büyüklükte lezyonların olduğu, derinin nekroze olduğu, zaman zaman kurumuş çamurla yaraların üzerlerinin kaplandığı, bölgeye basınç uygulayınca kabuk ve çamur örtüsünün altında biriken irinin ve akıntuların dışarıya çıktığı gözlenmiştir. Ayrıca bölgeden kötü koku geldiği, nekrotik dermatitisin yanı sıra ilerlemiş vakalarda tırnakların deformasyona uğradığı saptanmıştır (Şekil 2A-B).

Çalışmanın yapılması sırasında saha ve sürü taramalarında yetiştiricilerin bir kısmının piyetenin tedavisinde sadece ayaklardaki yarayı kapatıcı katran vb. maddeler uygulayarak iyileştirmeye çalıştıkları görülmüştür. Yetiştiricilerin büyük bir kısmının da uzun süre etkili (LA-Long Acting) parenteral antibiyotikleri kullandıkları ancak antibiyotik kullandıktan sonra süt ve eti belirli bir süre tüketmemeleri gerektiğini bilmedikleri, ilaç kalıntı arınma süresinden (İKAS) bihaber oldukları, durumu bilenlerin ise çok önemsemedikleri görülmüştür.

Yetiştiricilerin üretmiş oldukları bu et ve sütün İKAS beklenmeden gıda zincirine girmesi sebebiyle gıda güvenliği, halk sağlığı ve hayvan sağlığı için ciddi bir problemle karşı karşıya olduğumuz anlaşılmıştır.



**Şekil 2.** A) Piyetende purulent akıntı, B) Piyetende interdigital bölgede lezyon.

**Figure 2.** A) Purulent discharge in footrot, B) Lesion in the interdigital area with footrot.

### Tedavi Bulguları

Tablo 1'de orta ve şiddetli topallık semptomları gösteren toplam on piyetenli koyunda ilk uygulamadan 24 saat sonra %70'inde bir iyileşme görülmüş olup, ikinci uygulamadan 24 saat sonra ise %90'ında bir iyileşme görülmüştür. 96 saatin sonunda yapılan kontrolde %90 iyileşme oranı devam etmiş olup, iyileşen hayvanlarda nüks gözlenmemiştir. Bir vakada şiddetli derecede olan topallığın 96 saat sonunda hafif derecede topallık durumuna geldiği görülmüştür.

Tablo 2'de belirtilen tedavi gurubunda ilk uygulamadan 24 saat sonra %40'ında bir iyileşme görülmüş olup, 48 saatin sonunda %60 ve 96 saatin sonunda da %60'ında bir iyileşme gözlenmiştir. Ancak tablodan da görüleceği üzere 5. ve 9. sıradaki hayvanlarda 48 saatin sonunda topallık gözlenmezken aynı hayvanların 72 ve 96 saatin sonrasında topallık semptomu gösterdikleri ve iyileşmedikleri görülmüştür.

Tablo 3'de belirtilen gruptaki hayvanlarda 48 saatin sonrasında %10'unda bir iyileşme, 72 saatin sonrasında bu oran %20'ye çıkmış ve 96 saatin sonrasında da farklı bir durum gözlenmemiştir.

Herhangi bir tedavi uygulanmayan Tablo 4'deki grupta 24 ve 48 saatin sonunda %30'unda bir iyileşme hali gözlenirken 72 ve 96 saatin sonrasında sadece %10'unda bir iyileşme olduğu görülmüştür. Bu grupta 1, 3 ve 7. sıradaki hayvanlarda 24 ve 48 saat sonrasında kaybolan topallığın daha sonraki kontrollerde tekrar devam ettiği gözlenmiştir.

V. grup: Aşılardan koyunlarda iki-üç hafta aralıklarla yapılan kontrollerde sadece iki koçta rapel uygulamasından uzun bir süre sonra 3-4 gün süren hafif bir topallık görülmüş olup, bunun dışında yıl boyunca 230 baş hayvanın tamamında herhangi bir piyeten belirtisi görülmemiştir. Çevre köylerde piyeten hastalığından muzdarip yetiştiricilerin olduğu ve hastalığın üç ay boyunca sürülerinden çıkmadığı gözlenmiştir.

Kan serumlarındaki Ca, P, Zn ve Cu elementlerinin analiz sonuçları ve değerlendirilmesi Tablo 5-9'da belirtilmiştir.

#### İstatistiksel Bulgular

0-4 yaş dişi Morkaramanların aynı yaş dişi Akkaramanlara göre piyetenine daha dayanıklı oldukları (%7.81<%10.64), ancak aynı yaş erkeklerde Akkaramanlar daha dayanıklı görünmekle beraber (%12.50<%18.11) örnek erkek hayvan sayısının azlığı dolayısıyla tam olarak böyle bir yargıya varmanın mümkün olamayacağı söylenebilmektedir.

Yine cinsiyet ayrımı yapmaksızın 0-4 yaş aralığı için piyeten hastalığına karşı Morkaramanların Akkaramanlardan daha dayanıklı olduğu açıkça görülmektedir (%8.12<%10.73).

4 yaş üstü dişiler için Akkaramanların Morkaramanlara oranla biraz daha dayanıklı olduğu gözükmeyle beraber (%8.54<%9.20) önemli bir fark olarak değerlendirilmemekte ve daha önce hastalığa yakalanma oranının yüksekliği ve aynı hastalık antijenine karşı vücudun bağışıklık kazanmasının bunda etkili olduğu düşünülmektedir.

4 yaş üstü erkekler için Akkaramanlarda hasta hayvan bulunmadığından değerlendirilememiştir. 0-4 yaş Akkaraman erkeği ile 0-4 yaş Morkaraman erkeği oranlarında Akkaramanların daha dayanıklı oldukları (%12.50<%18.11) görünmekle beraber, 0-4 yaş Akkaraman erkeği ile 4 yaş üstü Morkaraman erkeği oranları birbirine yakın değerlerde çıkmıştır (%11.76<%12.50). Bu durumların çalışmaya dâhil edilen erkek hayvan sayısı azlığından kaynaklandığı düşünüldüğünden isabetli bir değerlendirme yapılamayacağı ortaya çıkmıştır.

Cinsiyet ve yaş ayrımı yapılmaksızın sadece ırk bazında yüzde oranlar değerlendirildiğinde Morkaramanların Akkaramanlara oranla piyetenine daha dayanıklı oldukları görülmektedir (%8.47<%10.02).

Sunulan çalışma kan parametreleri yönünden değerlendirildiğinde; Tablo 6'da görüldüğü üzere bakır, çinko ve fosfor bakımından sağlıklılar ile piyetenliler arasında fark olduğu görülmektedir. Piyetenli grupta hastalığa bağlı olarak, bakır değeri artmış (P<0.001), çinko (P<0.001) ve fosfor (P<0.01) değeri azalmıştır.

Korelasyonun önemli olduğu parametreler, sağlıklı koyunlar açısından değerlendirildiğinde fosfor ile çinko arasında negatif bir korelasyon (P<0.05) olduğu anlaşılmıştır. Piyetenliler açısından böyle bir korelasyondan bahsedilemeyeceği, bununla beraber genel değerlendirildiğinde ise çinko-bakır ve kalsiyum-bakır arasında negatif korelasyon (P<0.05) olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle hastalığa bağlı olarak piyetenlilerde bakır değerinde yükselme buna karşın çinko ve kalsiyum değerinde azalma görülmektedir. Sunulan çalışmada Ca ve P değerleri arasında istatistiki açıdan bir anlam bulunamamıştır (Tablo 6-9).

**Tablo 6.** Sağlıklı ve piyetenli koyunların biyokimyasal kan parametreleri.

**Table 6.** Biochemical blood parameters of healthy sheep and sheep with footrot.

Kan Parametreleri	Sağlıklı grup (n=20)	Piyeten grubu (n=20)
Bakır (mg/L)	4.57 ± 0.42**	5.06 ± 0.33
Çinko (mg/L)	1.51 ± 0.23**	1.194550 ± 0.21
Kalsiyum (mg/dl)	9.89 ± 0.96	9.67 ± 0.42
Forfor (mg/dl)	6.23 ± 0.83*	5.39 ± 0.78

Aynı satırda bulunan parametreler istatistiki olarak önemlidir. \*\*P<0.001, \*P<0.01

Grup istatistiğine göre bakır, çinko ve fosfor bakımından sağlıklılar ile piyetenliler arasında fark olduğu görülmüştür. Piyetenli grupta hastalığa bağlı olarak, bakır değeri artmış (P<0.001), çinko (P<0.001) ve fosfor (P<0.01) değeri azalmıştır.

**Tablo 7.** Sağlıklı hayvanların kendi içinde korelasyonu tabloda gösterilmiştir.

**Table 7.** Correlations among healthy animals are shown in the table.

	Bakır	Çinko	Kalsiyum
Çinko	.093		
Kalsiyum	-.276	-.091	
Fosfor	-.110	-.481*	.073

\*P<0.05

Korelasyonun önemli olduğu parametreler, sağlıklılar açısından değerlendirildiğinde fosfor ile çinko arasında negatif bir korelasyon (P<0.05) olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 8.** Piyetenli hayvanların kendi içinde korelasyonu tabloda gösterilmiştir.

**Table 8.** Correlations among animals with footrot are shown in the table.

	Bakır	Çinko	Kalsiyum
Çinko	-.233		
Kalsiyum	-.329	.226	
Fosfor	.124	.360	-.159

Korelasyonun önemli olduğu parametreler, piyetenliler açısından değerlendirildiğinde herhangi bir korelasyon belirlenmemiştir.

**Tablo 9.** Sağlıklı koyunlar ile piyetenli koyunların kendi içinde korelasyonu tabloda gösterilmiştir.

**Table 9.** The correlation between healthy sheep and sheep with footrot is shown in the table.

	Bakır	Çinko	Kalsiyum
Çinko	-.358*		
Kalsiyum	-.312*	.088	
Fosfor	-.266	.220	.072

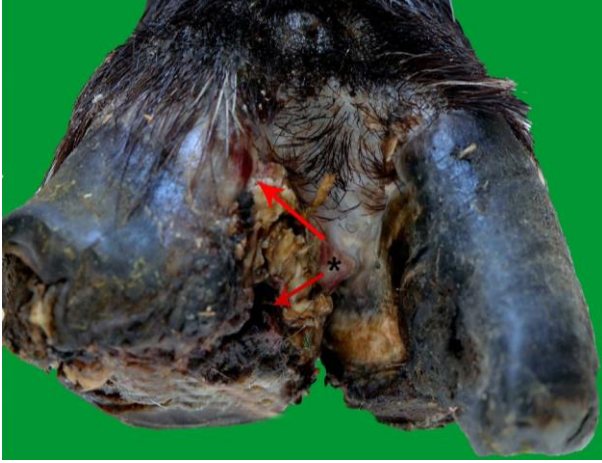
\*P<0.05

Korelasyonun önemli olduğu parametreler, genel değerlendirildiğinde ise çinko ile bakır ve kalsiyum ile bakır arasında negatif korelasyon (P<0.05) olduğu belirlenmiştir. Piyetenlilerde bakır değerinde yükselme

buna karşın çinko ve kalsiyum değerinde azalma görülmektedir.

### Makroskobik Bulgular

Koyunların ayak nekropsisinde tırnak arası deride nekrotik-ülseratif dermatitisin bulunduğu, tırnakların ise deformasyona uğradığı saptandı (Şekil 3). Bu interdigital derinin kesit yüzünde yangısal reaksiyonların tırnağın derin katmanların doğru yayıldığı, bu kısımlarda konjesyon ve ödem olduğu dikkati çekti (Şekil 4). Nekropsisi yapılan bu koyunların iç organlarının incelenmesinde morfolojik değişiklikler belirlenmedi.



**Şekil 3.** İnterdigital bölgede eroziv-ülseratif lezyon (\*) ve bunun çevresindeki bölgelerde deformasyonlar (oklar) izlenmektedir.

**Figure 3.** An erosive-ulcerative lesion (\*) in the interdigital area and deformations (arrows) in the surrounding areas are observed.

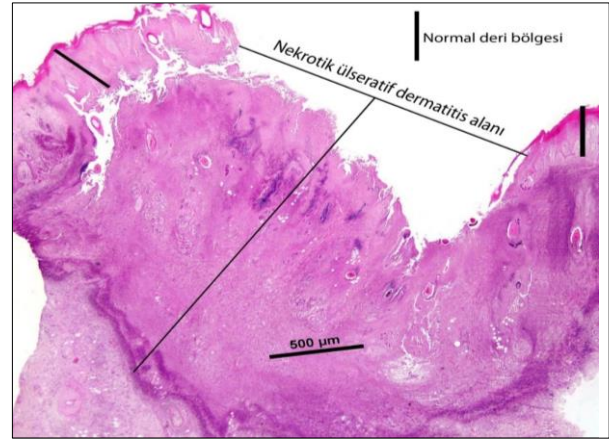


**Şekil 4.** Tırnağın kesit yüzünde ülserasyonlu bölgenin (\*) çevresinde yangısal reaksiyonların bölge derisinin derin katmanlarına doğru yayıldığı, bu kısımlarda şiddetli konjesyon ve eksudat birikiminden dolayı ödemli (oklar) olduğu görülmektedir.

**Figure 4.** On the cross-sectional face of the nail, it is seen that the inflammatory reactions around the ulcerated area (\*) spread towards the deep layers of the skin of the area, and these parts are edematous (arrows) due to severe congestion and accumulation of exudate.

### Mikroskobik Bulgular

Lezyonlu ayaklardan alınan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde nekrotik-ülseratif bölgeler ve çevresindeki dokularda da ödem, lökosit infiltrasyonları ve hiperemi yaygın olarak gözlenmiştir. Tırnaklar arasındaki ülserasyonların piyeten (footrot) hastalığı sonucu şekillenen lezyonlar olduğu saptanmıştır (Şekil 5).



**Şekil 5.** Lezyonlu doku örneklerinin mikroskobik incelenmesinde kısmen normal epidermis, deri, ülserasyon alanı ve geniş koagülasyon nekrozu, nekrozun çevresinde mor renkte yoğun lökosit ve bakteri proliferasyonlarından oluşan yangısal bir hat izlenmektedir.

**Figure 5.** Microscopic examination of lesional tissue samples reveals an inflammatory line consisting of partially normal epidermis, skin, ulceration area and large coagulation necrosis, purple dense leukocyte and bacterial proliferation around the necrosis.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaz dönemi ayları hariç yılın üç mevsiminde önemli miktarda yağış alan Muş'ta nemli ortamların olması nedeniyle özellikle küçükbaşların en önemli ayak hastalığı olan piyeten %9.14 oranında belirlenmiştir.

Piyeten hastalığı tedavi edilmediği veya geç fark edildiği zaman sürüdeki diğer sağlam hayvanlara da bulaşmaktadır. Bölgede mera hayvancılığı yaygın olarak yapıldığından ve meralar kontamine olduğundan her yıl hastalık sürüye bulaşabilmekte, dolayısıyla koyun yetiştiriciliğinde göz ardı edilemeyecek derecede önemli gelir kaybı anlamı taşımaktadır.

Hastalığın insidansı predispoze faktörlere bağlı olarak yörelere göre farklılık göstermektedir (Bulut 1982; Egerton ve Laing 1982; Heitz 1982; Parajuli ve Goddard 1989; Tulasne ve Beguin 1982). Sürülerdeki morbiditesinin%8-100, mortalitesinin%40'lara çıktığı bildirilmiştir (Heitz 1982; İzci 1993; Tulasne ve Beguin 1982). Sağlıyan (2003) Elazığ bölgesinde yaptığı çalışmada piyetenin görülme oranının %18.95 olduğunu bildirmekte olup, Bulut (1982), Doğu Anadolu Bölgesinde yaptığı bir çalışmada hastalığın insidansını Elazığ'da %15.4, Bingöl'de %9.1 ve Malatya'da %8.3 olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada oran %9.14 olarak tespit edilmiş olup Muş'un sınır komşusu olan Bingöl ilinin verisiyle örtüşmektedir.

Sağlıklı koyunların kan serumu Zn ve Cu düzeylerini; Altıntaş ve Fidancı (1993) Zn 0.80-1.17 mg/L ve Cu 0.58-1.6 mg/L, Alkan (1998), Zn 0.81-1.24 mg/L ve Cu 1.13-1.43 mg/L, Belge ve ark. (1996), Zn 0.45+0.022 mg/L, Sağlıyan ve ark. (2003), Zn 0.62-1.24 mg/L ve Cu 0.57-0.85 mg/L, Çamaş ve ark. (1997) Zn 0.25 +0.044 mg/L, Doğanay (1996) Zn 1.84 mg/L ve Cu 1.09 mg/L, Egerton ve Laing (1978) Zn 0.81-1.14 mg/L, Ghosal ve Mathur (1992) Zn 0.74-0.81 mg/L ve Cu 0.63-0.76 mg/L, Şahin ve ark. (2001) Zn 1.03-1.09 mg/L ve Cu 0.75-0.78 mg/L, Tiftik (1996) Zn 1.40 mg/L, Kelly (1974) Cu 0.7-1.3 mg/L, Nelson ve ark. (1984) Cu 0.84-1.0 mg/L, Kaneko (1980) Cu 0.58-1.6 mg/L olarak bildirmişlerdir.

Muş ve yöresi sağlıklı koyunlarında 1.51 mg/L olarak tespit edilen ortalama serum çinko düzeyi (Tablo 6), araştırmacılar Egerton ve Laing (1978), Tiftik (1996), Doğanay (1996), Alkan (1998) ile Sağlıyan ve ark. (2003)'nın bulgularına benzerlik göstermektedir. Çinko için tespit edilen bu ortalama değer Doğanay (1996)'ın bulgusundan düşük, Tiftik (1996)'in bulgusuna yakın, Alkan (1998), Sağlıyan ve ark. (2003), Egerton ve Laing (1978), Çamaş ve ark. (1997) ile Belge ve ark. (1996)'nın bulgularından yüksek bir değerde çıkmıştır. Bu durumun hayvanların beslendiği mera ve otlakların bitki örtüsü ve toprak yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Piyetenli koyunların ortalama serum çinko düzeylerini Sağlıyan ve ark. (2003), 0.47 mg/L, Alkan ve Yavru (2000), 0.68 mg/L, Belge ve ark. (1996), 0.23 mg/L, Egerton ve Laing (1978), 0.93 mg/L olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar Ersoy ve Bayşu (1986), Ghosal ve Mathur (1992), Belge ve ark. (1996) ile Sağlıyan ve ark. (2003), serum çinko düzeyinin 0.4 mg/L'nin altına düşmesinin çinko yetmezliğine bağlı semptomların görülmesine neden olacağını vurgulamışlardır. Serum bakır düzeyinin ise 0.5 mg/L'nin altında olması Serpek (1983) ve Doğanay (1996) tarafından hipokuprozis sınırı olarak belirtilmiştir.

Muş ve yöresi piyetenli koyunlarında ise 1.19 mg/L olarak tespit edilen ortalama serum çinko düzeyi (Tablo 6), araştırmacılar Ersoy ve Bayşu (1986), Ghosal ve Mathur (1992), Belge ve ark. (1996) ile Sağlıyan ve ark. (2003)'nın noksanlık sınırı olarak belirttikleri 0.4 mg/L'nin üstünde olması Muş ve yöresi koyunlarında sekonder çinko yetmezliğinden söz edilemeyeceğini göstermektedir.

Sağlıklı koyunların Zn ortalaması (1.51 mg/L) ile piyetenli koyunların Zn ortalaması (1.19 mg/L) noksanlık sınırının üzerinde olmasına rağmen piyetenlilerde önemli bir düşüşün olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç araştırmacılar Egerton ve Laing (1978), İzci (1993), İzci ve ark. (1994), Whittington ve ark. (1994), Grono-Thomas (1997), Belge ve ark. (1996), Alkan ve Yavru (2000) ile Sertkaya ve Şındak (2004)'ın sağlıklı koyunlara göre piyetenli koyunların serum çinko düzeylerinin daha düşük olduğu görüşleriyle benzerlik göstermektedir. Belge ve ark. (1996), hastalığın profilaksisinde ve sağaltımında çinkonun göz önünde bulundurulması gerektiğini ifade ederek, çinko yetmezliğinin yara iyileşmesinde önemli rol oynayan kollajenin sentezinde azalma ve kollajen liflerinin çapraz bağlanmasında anormalliklere neden olduğunu saptamışlardır. Kollajenin polisakarit ve muko proteinlerle birleşerek güçlü bir yapı oluşturduğunu böylece yara dudakları arasında sağlam bir bağlantı kurduğunu vurgulamışlardır.

Araştırmacılar Ası (1983), Bremmer (1970), Cousins (1989), Ersoy ve Bayşu (1986), Özgen (1970) ile Simenson (1980) sağlıklı koyunların serum Ca değerini 9.3-11.7 mg/dl, P değerini ise 4.0-7.3 mg/dl aralığında bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada Ca ve P değerleri arasında istatistikî açıdan bir anlam bulunamamıştır. Ancak piyetenli koyunlarda Ca değerindeki azalma istatistikî olarak tespit edilmiştir (P<0.05). Çalışmada sağlıklı ve piyetenli koyunların serum Ca değerleri sırasıyla 9.89 + 0.96 mg/dl ile 9.67 + 0.42 mg/dl olarak birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Piyetenli hayvanların serum Ca düzeyinde görülen azalma Belge ve ark. (1996)'nın bulgularıyla benzerlik göstermektedir (9.47+0.57 mg/dl ve 8.96+0.26 mg/dl). Ancak her iki düzey de koyunlar için bildirilen 9.3-11.7 mg/dl serum Ca düzeyi sınırları içerisinde kaldığından herhangi bir noksanlıktan söz edilemeyeceği değerlendirilmiştir.

Muş ve yöresinde gerçekleştirilen bu çalışmada koyunların kan serumlarında çinko yetersizliği tespit edilmemiştir. Ancak çinkonun özellikle yara iyileşmesinde, deri bütünlüğünün sağlanmasında ve kollajen liflerinin sağlam bağlanmasında çok önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bu sebeple toprakları, çayır-meraları çinkodan fakir ve rasyonlarında çinko ilavesi olmadan beslenen hayvanlarda çinko yetmezliğine bağlı piyeteneye karşı duyarlılık oluşacağı ve hastalık görülebileceğinden sağaltım seçeneklerinden biri olarak yeşillere çinko ilavesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Whittington (1995), piyetenin sağaltımında antibiyotiklerin etkili olabilmesi için asgari 18 saat kadar terapötik düzeyde kalması gerektiğini, bu nedenle uzun süreli antibiyotiklerin hastalığın tedavisi amacıyla kullanılması gerektiğini ifade etmektedir.

Casey ve Martin (1988), penisilin-streptomisin kombinasyonunun intramüsküler uygulanması ve %10'luk CuSO<sub>4</sub> solüsyonunun banyo şeklinde uygulaması ile üç ay içinde iyileşme elde edilebileceğini, Gönül ve ark. (2001), penisilin-streptomisin kombinasyonunun parenteral, %5'lik bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) solüsyonunun banyo şeklinde uygulanmasıyla %92, Bruere ve West (1993) ise penisilin-streptomisin kombinasyonu ile birlikte %10'luk ZnSO<sub>4</sub> banyosunda 5 dk. bekleterek yaptıkları uygulamalarda %90 başarılı olduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızdaki Ceftiofur+Flunixin-meglumın gurubunda %90 oranında iyileşme başarısı elde edilmiştir. Ayrıca sütlerin imha edilmesine gerek kalmaması çok avantajlı bir sağaltım seçeneği olarak görülmüştür.

Yarsan (2013); hayvansal gıdalardaki kalıntıların giderek artan global bir sorun olduğunu ve hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntılarının kaynaklanabilecek doku ve organlara olan etkileri, antibakteriyel direnç ve bağışıklık sisteminin etkilenmesi gibi riskler konusunda yetiştiricinin ve tüketicinin bilinçlendirilmesi ve bilgilendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Piyeten hastalığının tedavi sürecinde süte geçen antibiyotikler kullanılırsa ilaca göre değişmekle beraber 12-24 saım boyunca süütün insan gıdası olarak kullanılmaması gerekmektedir. Çalışmamız sırasında yetiştiricilerden aldığımız bilgiye göre daha önceki tedavi girişimlerinde toplamda ciddi miktarda gelir kaybına neden olduğu için sütlerin imha edilmesine sıcak bakmadıkları belirlenmiştir.

Odabaşıoğlu (1983), Morkaraman koyunların laktasyon süt verimlerinin 92.0 kg, laktasyon süresinin 167.2 gün olduğunu, Akkaramanların ise süt veriminin 73.6 kg ve laktasyon süresinin 146.9 gün olduğunu belirtmiştir. Dolayısıyla yetiştiriciler için süt, son derece kıymetli bir gelir kaynağı olmaktadır. Bu bilgiler ışığında çalışmada oluşturulan bir grupta yetiştiricilerin özellikle sütü gönül rahatlığıyla kullanmaları ve süütün heba olmasından kaynaklı zararlarını minimize etmek için, süte geçmeyen Ceftiofur ile yangı giderici (flunixin-meglumın) ajanla sağaltım girişimi yapılmış ve %90 oranında iyileşme elde edilmiş ve sonuçlar yetiştiricilerle paylaşılmıştır.

Karslı ve Elma (2014) da tek başına antiseptik olarak kullandıkları çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) ayak banyosu uygulamasının tedavide yetersiz olduğunu fakat, parenteral spiramisin ve vitamin E uygulamasıyla birlikte çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) ayak banyosu uygulamasının tedavide daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda %10'luk bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) solüsyonunun (grup III) banyo şeklinde uygulanmasıyla elde edilen %20 oranındaki başarının harcanan emek, zaman ve masraflar göz önüne alındığında hastalığı tedavi etmede yeterli olmadığı ve kontrol grubuyla (grup IV) arasında önemsiz

bir fark olduğu (%10) tarafımızca da belirlenmiştir. Ayrıca oluşturduğumuz bir başka grupta (grup II) hayvanlara %10'luk CuSO<sub>4</sub> + Flunixin-meglumün uygulanmasıyla 96 saatin sonunda %60 başarı elde edilmiş olsa da sonuçlarımız tarafımızca yetersiz bulunmuştur.

Parenteral antibiyotik destekli yapılan sağaltımda, süte geçmeyen Ceftiofur'un, yangı giderici bir ilaçla beraber kullanıldığında başarı yüzdesinin (%90) yüksek olması, 1-2 uygulama ile hastalığı kısa sürede tedavi etme yetkinliği ve yetiştiriciler tarafından rahatlıkla temini ve uygulanabilmesi yönleriyle piyetenin tedavisinde yetiştiricilere birçok yönden fayda sağlayacağı kanaati oluşmuştur. Antibiyotik destekli sağaltımın başarı yüzdesi belirtilen literatür verileriyle de uygunluk göstermektedir (Bruere ve West 1993; Casey ve Martin 1988; Gönül ve ark. 2001; Whittington 1995).

Lewis ve ark. (1989) 223 koyunda yapmış oldukları aşı uygulamasının ilk yılında piyetenin insidansını %61, ikinci yılda ise %45 oranında düşürdüklerini, enfeksiyona maruz kalan koyunlarda ise yapılan aşılamanın re-enfeksiyonları %92 oranında azalttığını belirtmişlerdir. Glenn ve ark. (1985) %83, Bulgin ve ark. (1986) ise %69 gibi oranlarda aşının piyetenin insidansını düşürdüğünden bahsetmektedirler.

Çalışmamızın V. grubunda 230 sağlıklı koyuna hastalıktan korunmak amacıyla *Bacteroides nodosus*'un 10 suşunu içeren yağlı adjuvanlı sıvı aşı uygulanmıştır. Bunlardan 228 baş koyunda bir yıl boyunca herhangi bir piyeten belirtisi görülmemiş olup, sadece iki koçta piyeten şekillenmiştir.

Aşıdan elde edilen sonuçların; aşılama aralığı, yaş, ırk, aşı suşu, ayak bakımı, tırnakların kesilmesi, ayak banyosu yapılması ve bireysel faktörler gibi birçok etkenden dolayı değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (Bulgin ve ark.1986; Glenn ve ark.1985; Lewis ve ark. 1989). Bu çalışmada kullanılan aşı sadece *Bacteroides nodosus*'a karşı etkili olduğundan iki koçta tam etki etmemesi hastalığın *Fusobacterium necrophorum*, bireysel faktörler veya bölgesel bir suştan kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.

Avki ve ark. (2004)'nın da belirttiği gibi aşı uygulamasından elde edilen başarının, aşının bölgesel suşlardan hazırlanmasıyla daha da artacağı düşünülmekle beraber, Lewis ve ark. (1989)'nın sadece enfekte koyunlarda aşı uygulamasının hem tedavi edici hem de re-enfeksiyonlara karşı korumada %92 oranında başarı elde etmeleri daha etkili ve daha düşük maliyetli olduğu için değerlendirilmesi gerektiği kanaati oluşmuştur.

Çalışmada ulaşılan sonuçlar şöyledir; Morkaraman ırkının Akkaraman ırka göre daha dirençli olduğunun belirlendiği bu çalışmada piyeten hastalığının %9.14'lük bir oranda ilkbahar ve sonbaharda sürülerde bulunduğu ve bunun et, süt, yapağı gibi verim kayıplarının yanı sıra, hastalığın tedavisi için veteriner hekim ve ilaç masraflarıyla beraber yetiştiriciye ciddi bir külfet oluşturduğu görülmüştür.

Hastalığın tedavisinde özellikle süte geçmeyen parenteral antibiyotiklerin kullanılması gıda güvenliği, gıda hijyeni, insan sağlığı ve hayvan sağlığı bakımından büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla çalışmada kullanılan Ceftiofur etken maddeli preparat ile yangı giderici Flunixin-meglumün'in başarı yüzdesinin yüksek olması, sadece hasta hayvanlarda uygulanması, daha az emek-zaman-masraf gerektirmesi, tedarik ve uygulamasının kolay ve pratik olması gibi nedenlerle yetiştiriciler tarafından arazi şartlarında, otlakta ve merada rahatlıkla uygulayabilecekleri kararına varılmıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## TEŞEKKÜR

Selçuk 3. Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresinde sözlü olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

## YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: FY, MG  
Tasarım: MG  
Denetleme/Danışmanlık: FY, MG  
Veri Toplama ve/veya İşleme: FY, MG  
Analiz ve/veya Yorum: FY, MG  
Kaynak Taraması: FY, MG  
Makalenin Yazımı: FY, MG  
Eleştirel İnceleme: FY, MG

## KAYNAKLAR

- Alkan F (1998).** Konya Bölgesindeki Koyunlarda Görülen Piyeten'in Etiyolojisinde Çinko ve Bakırın Rolü. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Alkan F, Yavru N (2000).** The role of copper and zinc in the etiology of foot rot of sheep in Konya region of Turkey. *Isr J Vet Med*, 56 (1), 48-52.
- Altıntaş A, Fidancı UR (1993).** Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 40 (2), 173-86.
- Avki S, Temizsoylu D, Yiğitarşlan K (2004).** Burdur yöresi koyunlarında ayak hastalıklarının dağılımı ve çevresel faktörler yönünden değerlendirilmesi. *Türk Vet Cer Derg*, 10(1-2), 5-12.
- Bagley CV (1998).** Sheep lameness In: The Merck Veterinary Manuel. Asello SE (Ed), 850-55, National Publishing Inc, Philadelphia,
- Belge A, Bakır B, Bildik A, Yur F (1996).** Piyetende kan kalsiyum, Fosfor ve Çinko düzeyleri üzerine bir araştırma. *YYÜ Vet Cer Derg*, 2 (1), 11-5.
- Bremmer I (1970).** Zinc Copper and Manganese in the Alimentary Tract of Sheep. *Br J Nutr*, 24, 769-83.
- Bruere AN, West DM (1993).** Foot diseases and lameness in the sheep. In: Health disease and production. Found. Vet Cont Ed, 224-30, Palmerston North, New Zealand.
- Bulgin MS, Lincoln SD, Lane VM, Matlock M (1986).** Comparison of treatment methods for the control of contagious ovine foot rot. *JAVMA*, 189(2), 194-6.
- Bulut S (1982).** Elazığ ve Yöresi Koyun ve Keçilerde görülen piyetenin etiyoloji, klinik seyir, epidemiyolojisi ile sağtımlarının karşılaştırılması araştırması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
- Casey RH, Martin PA (1988).** Effect of footrotting of sheep affected with footrot on response to zinc sulphate/sodiumlauryl sulphate foot bathing treatment. *Aust Vet Journal*, 65(5), 258-9.
- Cousins RJ (1989).** The critical and Practical Aspects of Zinc up take and Absorption In: Mineral Absorption in the Monogastric GI Tract. Advances in Experimental Medicine and Biology, Dintzis FR; Laszlo JA (Eds), 249, Springer, Boston.
- Çamaş H, Bildik A, Gülser F (1997).** Toprak, bitki ve koyunların kanında çinko miktarlarının araştırılması. Ulusal Çinko Kongresi, Eskişehir, Türkiye.
- Doğanay S (1996).** İzmir bölgesi koyunlarında kan serum bakır (Cu), demir (Fe), total demir bağlama kapasitesi (TDBK) ve çinko (Zn) düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Egerton JR, Laing EA (1978).** Bacterial infections in the aetiology of foot disease of ruminants. In: The second symposium on Bovine Digital Disease, Sakara, Sweden.
- Egerton JR, Laing EA (1982).** Comparison of bacteroides nodosus infection in sheep and cattle. In: Fourth international symposium on Disorders of Ruminant Digit, Maisons-Alfort, Paris.
- Ersoy E, Baysu N (1986).** Biyokimya. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayınevi, Ankara.
- Ghosal AK, Mathur GN (1992).** Zinc copper and iron contents of blood serum of cattle-sheep in semi-aridtract of rajasthan. *Indian J Anim Sci*, 62(5), 441-2.

- Glenn J, Carpenter TE, Hird DW (1985).** A field trial to assess the the rapeuti can dprophylactic effect of a footrot vaccine in sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 187, 1009.
- Gönül R, Or ME, Dodurka HT(2001).** Koyunlarda piyeten hastalığının saha koşullarında penisilin+streptomisin kombinasyonu ve/veya bakır sülfat ayak banyosu ile tedavisi. *İst Üniv Vet Fak Derg*, 27 (1), 171-7.
- Grono-Thomas R (1997).** Virülant footrot in sheep. *Vet Rec*, 141(1), 26-7.
- Heitz F (1982).** Control on Footrot in Sheep. In: Fourth international symposium on Disorders of Ruminant Digit, Maisons-Alfort, France.
- İzci C (1993).** Koyunların önemli bir ayak hastalığı; Piyeten. *Hasad*, 94, 26-8.
- İzci C, Koç Y, Avki S, Kul M (1994).** Konya bölgesi koyunlarında görülen extremitte ve ayak hastalıklarının klinik ve radyolojik olarak değerlendirilmesi. *Vet Bil Derg*, 10(1-2), 16-21.
- Kaneko JJ (1980).** Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press, London.
- Karlı B, Elma E (2014).** Koyunlarda Piyeten Hastalığında Farklı Tedavi Yöntemlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. 14. Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi, Antalya, Türkiye.
- Kelly WR (1974).** Veterinary Clinical Diagnosis. Bailliere Tindall, London.
- Lewis RD, Meyer HH, Gradin JL, Smith AW (1989).** Effectiveness of Vaccination in Controlling Ovine Footrot. *J Animal Sci*, 67, 1160-6.
- Nelson DR, Wolff WA, Blodgett DJ, Luecke B, Ely RW, Zachary JF (1984).** Zinc deficiency in sheep and goats: Tree field cases. *JAVMA*, 184(12), 1480-5.
- Odabaşoğlu F (1983).** Morkaraman, Akkaraman ve İvesi Koyunlarının Süt Verim Özelliklerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Özgen H (1970).** Hayvan Beslemede Organik ve Anorganik Besin Maddeleri ve Vitaminler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi, Ankara.
- Parajuli B, Goddard PJA (1989).** Comparison of the efficacy of foot bath scontaining formalinor zincs ulphate in treating ovine footrot under field conditions. *Br Vet J*, 145, 467-72.
- Sağhyan A, Güney C, Koparır M (2003).** Elazığ bölgesinde koyunlarda görülen Piyeten'in etiolojisinde çinko ve bakırın rolü. *Vet Cer Derg*, 9(1-2), 11-6.
- Sağhyan A (2003).** Elazığ bölgesi koyunlarında görülen ayak hastalıklarının klinik olarak değerlendirilmesi. *FÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 17(1), 39-44.
- Samsar E, Akın F ve Anteplioğlu H (1996).** Klinik Tanı Yöntemleri ve Genel Cerrahi. Tamer Matbaacılık, Ankara.
- Sertkaya H, Şındak N (2004).** Şanhurfa'nın Birecik İlçesi ve köylerinde koyun piyetenin insidansı ve iki ayrı ilaç kombinasyonu ile sağaltımı. *Vet Cer Derg*, 10(1-2), 48-54.
- Simenson MG (1980).** Calcium, Phosphorus and Magnesium Metabolism. In; Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Kaneko JJ (Ed), Academic Press, Inc.
- Şahin T, Çimtay İ, Aksoy G (2001).** Pikalı ve sağlıklı kuzuların bazı biyokimyasal parametreleri üzerine araştırmalar. *Türk J Vet Anim Sci*, 25(4), 603-6.
- Tiftik AM (1996).** Klinik Biyokimya. Mimoza Yayınları, Konya.
- Tulasne JJ andBeguın JC (1982).** Ovinefootrot. In: Fourth International symposium on Disorders of Ruminants Digit, Maisons-Alfort, France.
- Whittington RJ (1995).** Obsencations on the indirect transmission of VFR in sheep yards and its spread in sheep on unimproved pasture. *Aust Vet Journal*, 4, 72, 132-4.
- Whittington RJ, Saunders VF, Moser EK (1994).** Antigens for serological diagnos of ovine footrot. *Veterinary Mikrobiology*, 54, 255-74.
- Yarsan E (2013).** Hayvansal Gıdalarda Veteriner İlaç Kalıntıları. Uluslararası 2. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, Konya, Türkiye.
- Yavru N, Özkan K, Elma E (1989).** Ayak hastalıkları ve ortopedi. Basım Ofset Matbaası, Ankara



## Diagnostic Importance of Methylmalonic Acid and Vitamin B<sub>12</sub> in Cattle with Simple Indigestion

Vedat BALDAZ<sup>1,\*</sup> Abdullah KAYA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Siirt, Turkey

<sup>2</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Van, Turkey

Received: 11.02.2021

Accepted: 14.03.2021

### ABSTRACT

In this study, it is aimed to reveal the diagnostic importance of methylmalonic acid (MMA) and vitamin B<sub>12</sub> in cattle with simple indigestion. For this purpose, a total of 50 different breeds and ages of cattle, 10 healthy (control group) and 40 with simple indigestion, were used. Cattle with indigestion were determined according to the anamnesis, clinical and rumen content examination findings. Blood serum samples and rumen contents were taken from each cattle to determine the levels of MMA and vitamin B<sub>12</sub>. It was determined that the amount of methylmalonic acid in the group with indigestion increased compared to the control group (P<0.05). When compared with the control group, vitamin B<sub>12</sub> level decreased in the indigestion group, but this decrease was not statistically significant (P>0.05). A negative correlation was found between MMA and vitamin B<sub>12</sub> in both simple indigestion and control groups. As a result, determination of methylmalonic acid and vitamin B<sub>12</sub> levels in cattle with simple indigestion was found to be important in terms of diagnosis.

**Keywords:** Cattle, Methylmalonic acid, Simple Indigestion, Vitamin B<sub>12</sub>

### ÖZ

## Basit İndigesyonlu Sığırlarda Serum Metilmalonik Asit ve B<sub>12</sub> Vitamini Düzeylerinin Tanısal Önemi

Bu çalışmada, basit indigesyonlu sığırlarda metilmalonik asit (MMA) ve B<sub>12</sub> vitamininin tanısal açıdan öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla 10 sağlıklı (kontrol grubu) ve 40 basit indigesyonlu olmak üzere toplam 50 farklı ırk ve yaşta sığır kullanıldı. İndigesyonlu sığırlar anamnez, klinik ve rumen içeriği muayene bulgularına göre tespit edildi. Her sığırdan MMA ve B<sub>12</sub> vitamin düzeylerini saptamak için kan serum örnekleri ve rumen içerikleri alındı. İndigesyonlu gruptaki MMA miktarının kontrol grubuna göre arttığı (P<0.05) belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında basit indigesyon grubunda vitamin B<sub>12</sub> düzeyinin azaldığı, fakat bu azalmanın istatistiki olarak (P>0.05) anlamlı olmadığı görüldü. Hem basit indigesyonlu hem de kontrol grubunda MMA ve vitamin B<sub>12</sub> arasında negatif bir korelasyon olduğu saptandı. Sonuç olarak; basit indigesyonlu sığırlarda MMA ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin belirlenmesi tanısal açıdan önemli olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Basit indigesyon, Metilmalonik asit, Sığır, Vitamin B<sub>12</sub>

### GİRİŞ

Basit indigesyon, beslemede kullanılan yemin kalitesi, miktarı ve içeriğinde ani değişim, düzensiz yemleme, yem kalitesindeki bozulma ve diğer faktörlere bağlı ön mide motilitesi veya fermentatif aktivitesinde gözlenen küçük çaplı anormalliklerdir (Garry 2009; Constable 2010). Ön midelerde başlangıçta anormal bir fermentasyon olmaksızın birçok biyokimyasal faaliyet aksar, hatta tamamen durur. Yani ön midelerdeki total biyolojik aktivite düşer. Basit ön mide disfonksiyonu, ruminantların en

çok görülen hastalığıdır. Öncelikle yemleme hatalarına bağlı olarak oluşan ve genellikle subklinik seyreden bu hastalığa kalitatif ve kantitatif açlık çeken hayvanlarda rastlanır (Gül 2012).

Ruminantlarda her türlü beslemede, o rasyonun terkinbine uygun bir ön mide mikroflorasına ihtiyaç vardır. Rasyon değişikliğinde ön mide mikroflorasının yeni duruma adaptasyonu için yaklaşık 10-14 güne ihtiyaç vardır. Bu nedenle rasyondaki ani değişiklikler önemli sindirim bozukluklarına yol açmaktadır (Gül 2012).

Yüksek veya düşük kaliteli yeme ani geçişler,



konsantre yemden yeşil mera beslemelerine veya tam tersine ani geçişlerde yaygın olarak gözlenir (Radostits ve ark. 2007; Constable 2010). Donmuş, bozulmuş, aşırı ısınmış, çürük veya küflü buğday, yem, saman, sorgum koçanı ve silaj gibi besin maddelerin kullanılması, aminleri (histamin, tryptamin vb.) içeren albümince zengin silajların (mısır, yonca, şeker pancarı posası vb.) verilmesi, büyük miktarlarda ıslak ot alımı, rasyona üre ilavesine ani geçiş, rumen florasını olumsuz yönde etkileyen uzun süreli veya yoğun oral antibiyotik, sülfonamid ve antiseptiklerin kullanımı, besi sığırlarında monensin sodyum ihtiva eden rasyonlara ani geçiş, süt inekleri için hazırlanmış olan linkomisine (%0.005 mg/kg) kontamine konsantre rasyonlar ve koruyucu kimyasallar içeren yemlerin kullanımı hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Aytuğ ve ark. 1991; Smith 2009; Foster 2013; Altuğ 2014).

Yemlemedeki anormalliğe bağlı primer atoni oluşumunun mekanizmasını açıklamak zordur. Ancak, aşırı tane yem alımı, yüksek proteinli yemlerin aşırı tüketimi veya protein kokuşması ve bozuk gıdalarla beslenmeye bağlı içeriğin pH'sındaki küçük veya belirgin değişiklikler (asidite veya alkalite artışı), sindirilemeyen gıdanın birikimine bağlı fiziksel etkiler, rumende değişen şartlara bağlı (aşırı tane yem alımı, proteince zengin yemlerin kokuşması gibi) üretilen toksik aminler (histamin vb.) ve amidlerin üretimi, rumenin motilitesini baskılayarak veya engelleyerek ruminal atoniye neden olabilir (Aytuğ ve ark. 1991; George ve ark. 2006; Radostits ve ark. 2007).

Ruminantlarda normal şartlarda kobalamin yetersizliği genellikle söz konusu olmayabilir. Ancak mide tembelliklerinde, bozulmuş sindirim veya yetersiz beslenme ve bağırsaklara bağlı malabsorbsiyonlarda B<sub>12</sub> vitamini eksikliği görülmektedir (İmren ve Şahal 1991). B<sub>12</sub> vitaminini sentezleyebilen hayvanların ön midelerinde, oluşumdan sorumlu bakterilerin yetersizliği veya mideden İntrinsik faktör salgınmasındaki aksaklıklar da B<sub>12</sub> vitamin yetersizliğinin başlıca nedenidir (Altınsoy 2001).

Basit indigesyonlarda rumen mikroflorasının inaktivitesi nedeniyle B vitaminleri yetersizliği oluşur. Çünkü rumen mikroorganizmaları vücutta birçok önemli metabolik reaksiyonlar için konak hayvana gerekli olan B vitamini sağlarlar (George ve ark. 2006).

Kobalamin olarak da bilinen B<sub>12</sub> vitamini, yalnızca mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, eritrositlerin olgunlaşması için ihtiyaç duyulan ve suda eriyen bir hematopoietik vitamindir (Smith et al 1952). Daha önceleri ekstrinsik faktör veya antipernisöz faktör olarak yaptığı etkisi ile biliniyordu. Mikrogram ile ölçülecek çok ufak miktarları ile etki yapar. Homosisteini metiyonine dönüştüren kritik metil transfer reaksiyonu ve L-metilmalonil-KoA'yı süksinil-KoA'ya dönüştüren özel

bir reaksiyon için koenzim olarak fonksiyon görür (Bingöl 1997; Şenes 2013).

Vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinde, adenoilkobalaminin metilmalonil-KoA mutazın kofaktörü olması nedeniyle, kanda MMA birikmesine neden olur. Vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinde serum vitamin B<sub>12</sub> düzeylerindeki azalma ölçülebilir hale gelmeden önce serum ve idrar MMA konsantrasyonlarında artış meydana gelir. Bu nedenle MMA, doku düzeyindeki vitamin B<sub>12</sub> eksikliğini göstermesi açısından son derece önemli bir tanısal belirteçdir (Gebarski ve ark. 1983; Şenes 2013).

MMA, molekül ağırlığı düşük (118 g/mol), doymuş, oldukça polar, plazma proteinlerine bağlanmayan ve kısa zincirli bir dikarboksilik asittir. Hücre içi öncü maddesi olan D-metilmalonil-KoA, birkaç amino asit (valin, izolösin, metiyonin, treonin), tek zincirli yağ asidi, kolesterol ve timidin gibi metabolik yolların kesişme noktasıdır. İzomerleştirme, kofaktör olarak adenoilkobalamin gerektiren metilmalonil-KoA mutaz enzimi tarafından katalize edilir (Schneede ve Ueland 1993).

Metilmalonik asit, metilmalonik asidemi (görülme sıklığı 1:48 000 canlı doğum) olarak bilinen bir grup kalıtsal hastalık için özgül tanı koydurucu bir belirteçdir (Şenes 2013). Metilmalonik asideminin sonradan kazanılan nedenleri (vitamin B<sub>12</sub> eksikliğine bağlı komplikasyonlar) ise daha sık görülür. Plazma ve idrarda artmış MMA, mide atonisi, bağırsaklara bağlı malabsorbsiyon, bozulmuş sindirim veya yetersiz beslenmeye bağlı vitamin B<sub>12</sub> eksikliklerinde görülür. Aynı zamanda renal yetmezlik, hipovolemi ve ince bağırsakta aşırı bakteri çoğalması da vücut sıvılarında MMA düzeyinin artmasına sebep olmaktadır (Magera ve ark. 2000; Şenes 2013).

Metilmalonil-KoA mutaz'ın kofaktör olarak adenoilkobalamin ihtiyacı nedeniyle, kobalamin metabolizmasındaki bozukluklarda hücre dışı MMA seviyesi idrarda ve plazmada artış gösterir (İspir 2012). Bu artış nedeniyle MMA tayini, B<sub>12</sub> vitamininin eksikliğinde öncelikli tercih edilen fonksiyonel göstergesidir (Akış 2012).

İndigesyonlarda tanı amacıyla birçok biyokimyasal parametre çalışılmıştır. İndigesyonların şiddeti ve süresi ile ilişkili çalışmalara ihtiyaç vardır. Metilmalonik asit, mide tembellikleri, bağırsaklara bağlı malabsorbsiyon, bozulmuş sindirim veya yetersiz beslenmeye bağlı vitamin B<sub>12</sub> eksikliklerinde serum, plazma ve idrarda düzeyi artar (Gebarski ve ark. 1983; Elin ve Winter 2001). Bu çalışma ile ilk defa basit indigesyonlu sığırlarda rumen atonisine bağlı MMA ve B<sub>12</sub> vitamin düzeylerinin değişimleri ve tanıdaki öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır.

#### MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın hayvan materyalini, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine hastalık şüphesi ile getirilen ve yapılan



muayeneler sonucunda basit indigestiyon teşhisi konulan 2-7 yaşında, farklı ırk ve cinsiyete sahip 40 sığır hasta grubunu oluşturdu. Vatandaşların elinde bulunan ve yapılan muayene sonucunda sağlıklı olduğu belirlenen 10 adet sığır kontrol grubunu oluşturdu. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27.04.2017 tarih ve 2017/04 sayılı yazısı ile bu çalışmanın etik kurul onay belgesine gerek olmadığı belirtilmiştir.

Kliniğe getirilen ve Basit İndigestiyon ön tanısı konulan sığırlardan tanı amacıyla içerik sondası ile rumen içeriği ve biyokimyasal parametrelerin analizi için antikoagülsiz tüplere (Hema&Tube®) vena jugularisten prosedürüne uygun kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj cihazında (Rotofix32®-Hettich) 3500 devirde 10 dk. santrifüj edilerek serum örnekleri çıkarıldı. Elde edilen serum örnekleri biyokimyasal analizleri yapılmaya kadar serum saklama tüplerinde (Eppendorf) derin dondurucuda -20 C°'de muhafaza edildi.

Anamnezle belirlenen hasta sığırlardan rumen içeriği sondasıyla usulüne uygun alınan rumen içeriğinin rengi, kokusu, kıvamı ve pH'sına bakıldı ve kayıt altına alındı. Mikrobiyal fauna hareketleri (canlılık, hareket, yoğunluk) için mikroskopta bakılıp kayıt altına alındı. Metilmalonik Asit analizi (Bovine Methylmalonic Acid ELISA Kit kullanılarak) test kitlerinin prosedüründe belirtildiği şekilde ölçümleri ELISA yöntemiyle (ELISA Reader®-DAS) yapıldı.

B<sub>12</sub> vitamini için serum örnekleri toplu olarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun Odabaş Tıp Merkezi Hastanesi, Merkez Biyokimya Laboratuvarı Hormon biriminde (Architect Ci 16200® Abbott) kimyasal immün analiz yöntemi ile ölçüldü.

#### İstatistik Analizleri

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grup ortalamalarını karşılaştırmada Student t testi kullanıldı. Özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemede gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Pearson korelasyon katsayıları hesaplandı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5

olarak alındı. Tüm hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

### Klinik Bulgular

Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen sığırlar, sistemik olarak klinik yönden muayene edildi. Süt veriminde düşüş, 3 günden bir haftaya kadar değişen sürede yem ve su tüketiminin az veya hiç olmadığı, halsizlik, genel durum bozukluğu, tüylerde karışıklık, rumende atoni ve bazı olgularda da ishal saptandı.

Hasta hayvanların yapılan klinik muayenelerinde vücut ısısı ve nabız frekansının pek değişmediği, rumen hareketlerinin önemli derece azaldığı ve rumen kontraksiyon gücünde de düşüş olduğu görüldü. İçerik sondasıyla alınan rumen sıvılarının muayenesinde pH değerinin 6.0-8.0 aralığında olduğu görülmüştür. İçeriğin kıvamı genel olarak viskozdan suluya kadar değişkenlik göstermektedir. Alınan taze rumen içeriğinin rengi çoğunlukla kahverengi bazen de yeşilimsi ve sarımsı olduğu gözlemlenmiştir. Rumen içeriğinin kokusu ise daha çok keskin ekşimsi, bazılarında ise fena bir koku ve küf kokusu olduğu görülmüştür. İnfusoriaların durumu, yoğunluk, canlılık ve hareketlerine bakılarak (+, -) şeklinde değerlendirildi. Genellikle yoğunlukları orta derecede veya daha az, hareketleri ise az veya hiç yoktu, canlılık da genellikle negatif olarak saptandı. İnfusorialar hareket açısından yapılan değerlendirmede (+/-) olarak saptandı.

Kontrol grubu sığırlarda da rumen hareket sayıları, rumen kontraksiyon gücü, nabız frekansı ve vücut ısısı gibi değerler ölçülmüş, bulguların referans sınırları içinde olduğu görülmüştür.

Kontrol grubu sığırların rumen sıvısının pH değeri, 6.0-7.0 aralığında ölçülmüştür. Rumen içeriği viskoz kıvamında olup rengi ise genellikle yeşilimsi ve kahverengimsi görünümündedir. Rumen içeriğinin kokusu ise normal olup aromatik bir koku özelliğine sahiptir. İnfusoriaların durumunu tespit etmek için taze olarak alınan rumen içeriğine mikroskopta bakıldı; hepsinde infusorialar canlı, hareketli ve yoğunlukları yeterli (+++) derecede olduğu gözlemlendi.

**Tablo 1.** Basit indigestiyonlu ve kontrol grubu sığırlarda serum MMA ve vitamin B<sub>12</sub> değerleri.

**Table 1.** Serum MMA and vitamin B<sub>12</sub> values in cattle with simple indigestion and control group

Parametreler	Kontrol grubu (n=10)		Basit indigestiyon grubu (n=40)		P değeri
	(Xmin-Xmax)	Ortalama (X±s x̄)	(Xmin-Xmax)	Ortalama (X̄±s x̄)	
Metilmalonik asit (µmol/L)	17.64-76.65	45.89±5.65	8.08-190.85	75.99±5.86	.017 P<0.05
Vitamin B <sub>12</sub> (pg/ml)	142-264	207.20±13.51	83-281	199.02±7.96	.639 P>0.05

### Laboratuvar Bulguları

Çalışmada basit indigestiyonlu ve kontrol grubu sığırların MMA ve vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir.

İndigestiyonlu grupta MMA düzeyleri (75.99±5.86), kontrol grubu MMA düzeylerine (45.89±5.65) göre yaklaşık %66 arttığı tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (P<0.05). İndigestiyonlu grupta vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri (199.02±7.96), kontrol grubuna (207.20±13.51) göre azalmasına rağmen istatistiksel açıdan önemsiz (P>0.05) bulunmuştur.

Kontrol gruplarındaki vitamin B<sub>12</sub> normal değerlerde ölçülürken MMA ise daha düşük olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre MMA ve vitamin B<sub>12</sub> arasında negatif bir korelasyonun (-.248) olduğu tespit edilmiştir.

İndigestiyon grubundaki sığırlarda vitamin B<sub>12</sub> düzeyi azalırken MMA seviyesinin ise kontrol grubuna göre yaklaşık %66 daha fazla arttığı tespit edildi. Metilmalonik asit ile vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri arasında negatif bir korelasyon (-.168) olduğu görüldü.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada hayvansal gıda üretiminde çok önemli bir yere sahip olan sığırlar insanlar tarafından doğrudan değerlendirilme imkanı olmayan kaba ve selülozca zengin yemleri hayvansal proteine dönüştürme kapasitesine sahiptir. Ruminantlarda sindirim sisteminin sağlıklı çalışması ile verim arasında pozitif bir korelasyon vardır (Başoğlu 1998). Ön mide hastalıkları, sığırların sindirim

sistemi hastalıkları içerisinde önemli bir yere sahiptir (İmren 1978; Garry 2009; Dabak 2009).

Şimşek ve Kaya'nın (2006), Van ili ve çevresinde 2000-2003 yılları arasında görülen hastalıkların insidansının belirlenmesi için yaptıkları bir çalışmada, sindirim sistemi hastalıkları %16.09, dolaşım sistemi hastalıkları %1.32, üriner sistem hastalıkları %0.66, solunum sistemi hastalıkları %10.66, sinir sistemi hastalıkları %0.36, deri hastalıkları %0.69 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Sekin ve ark. (1996), 1992-1997 yılları arasında Van ve çevresinde sığır hastalıkları insidansının belirlenmesi için yaptıkları bir çalışmada; hastalıkların yerleştikleri sistemlere göre Van Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen hayvanlarda en çok sindirim sistemi (%57.1) ve en az üriner sistem (%0.8) hastalıkları tanısı konulduğunu saptamışlardır. Sindirim sistemi hastalıkları içinde ön mide hastalıkları (%39.6) önemli bir yer tutmakta olduğunu, indigestyonların bu sindirim sistemi hastalıklarının %28.3'ünü oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Basit indigestyon; genellikle rasyona kalitatif ya da kantitatif bir değişime bağlı olarak ortaya çıkan, hem besi hem de süt sığırcılığında yaygın olarak gözlenen ön mide hareketlerinin ve fonksiyonlarının aksamasıdır (İmren ve Şahal 1991; Dodurka 2012). Sığırların ani yem değişikliği, yem kalitesindeki bozulma ve yemlemedeki düzensizlik sebebiyle ön midelerindeki mikrofaunanın yeni besine uyum sağlayamamasından ileri gelen ön midelerin atonisi, iştahsızlık, rumen hareketlerinin azalması, hafif bir timpani, kabızlık bazen ishale seyreden bir sindirim sistemi hastalığıdır (Aytuğ ve ark. 1991; Balıkcı ve Yılmaz 1999; Dabak 2009).

Sindirimi zor kaba yem ve beyaz saman içeren rasyonlar, ani rasyon değişiklikleri, meradan ahır veya ahırdan mera besisine hızlı geçişler, rasyonda enerji miktarının artması, tek yönlü beslenme, özellikle protein tüketimindeki yetersizlik, küflü, donmuş, kirlenmiş ve fazla miktarda tahlil içeren rasyonların tüketilmesi, doğum yapan ineklerin plasentalarının yenmesi, uzun süreli antibiyotik, sülfonamid veya dezenfektanların kullanılması ve ahırda fazla tutulma neticesinde hareketsizlik veya yem tüketiminin azalmasına neden olan bazı hastalıklar (ön mide veya abomasum disfonksiyonları ve diğer organ hastalıkları gibi) nedeniyle rumen mikroorganizmalarının adaptasyonunun bozulması sonucu meydana gelir (Balıkcı ve Yılmaz 1999; Batmaz 2010; Dodurka 2012; Gül 2012).

Yapılan bu çalışmada, hayvanlardan alınan anamnez bilgilerine göre hayvanların çoğu sadece beyaz samanla beslendiği ya da saman ve arpa ile tek yönlü bir beslenmeye tabi tutulduğu tespit edilmiştir. Bazen de ani rasyon değişikliklerinin yapıldığı, kokuşmuş bozuk yemlerin yenmesi sonucu, 2 ile 14 gün arasında bir iştahsızlığın ortaya çıktığı, hayvanda verim düşüklüğünün olması araştırmacıların (Smith 2009; Constable 2010; Batmaz 2010) sığırlarda basit indigestyon etiolojisi için bildirdikleri nedenlerle benzerlik göstermektedir. Klinik değerlendirme sonrası indigestyondan şüphelenilen sığırlarda kesin tanı koyabilmek için, rumen içerik sondasıyla usulüne uygun alınan rumen içeriğinin kıvamı çoğunlukla sulu olduğu, kokusunun ekşimsi, kokuşmuş ve küf kokusunda olduğu, renginin ise genellikle kahverengi olduğu, bazılarında ise yeşilimtıraktan sarımtırağa kadar değişkenlik arz ettiği tespit edildi. Bu çalışmadaki sığırlarda rumen içerik pH'sı 6.0-8.0 aralığında ölçülmüştür. Bu da gösteriyor ki basit indigestyonlu sığırlarda pH değeri geniş bir skalaya sahip olup normal değerden asidik veya alkalik yöne kayabilmektedir. Elde edilen bu veriler, araştırmacıların (Başoğlu 1998; Herdt

2007; Garry 2009; Gül 2012; Altuğ 2014) bildirdikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

İndigestyon tanısı amacıyla bakılması gereken önemli başka bir parametre de; rumen içeriği infusoriarlarının durumudur. İnfusoriarların yoğunluk, canlılık ve hareketleri incelendiğinde; infusoriarların yoğunluğunun azaldığı veya hiç bulunmadığı, canlı olanlarında hareket kabiliyetinin çok zayıf veya hiç olmadığı tespit edildi. Kontrol grubu sığırlarda ise infusoriarlar çok yoğun olup canlılık ve hareket kabiliyetlerinin yüksek olduğu görüldü. Tespit edilen bu bulgular, araştırmacıların (Garry 2009; Dabak 2009; Batmaz 2010; Altuğ 2014) bulgularıyla paralellik arz etmektedir.

Metilmalonik asit, izolösin, valin, metionin ve treonin gibi dalı zincirli aminoasitlerin katabolizmasındaki bozukluk sonucu artan, tanisal önemi olan bir parametredir. Metilmalonil-KoA'nın süksinil-KoA'ya dönüşümünde bozukluk sonucu kanda ve idrarda biriken MMA santral sinir sistemine, böbrek ve kemik iliğine toksik etki göstermektedir (Aygün ve ark. 2015). Ayrıca vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinde metiyonin sentezinin yetersiz fonksiyonu sonucu homosistein seviyesi yükseldiği rapor edilmektedir (Graham ve O'Callaghan 2002).

Vitamin B<sub>12</sub> eksikliği gastrointestinal sistemde otonomik disfonksiyon, motilite bozuklukları, anoreksi, meteorizm, kabızlık, diyare, iştahsızlık ve nörolojik komplikasyonlara yol açar. Vücut hücrelerinde vitamin B<sub>12</sub> eksikliği nedeniyle Metilmalonil-KoA süksinil-KoA'ya dönüşemez. Bu nedenle vücut sıvılarında (serum, plazma ve idrar) MMA seviyesi artar (Wintrobe ve ark. 1981; Schneede ve Ueland 1993; Kılıçkap 2012).

L-metilmalonil-KoA'nın, kofaktör olarak adozilkobalaminin kullanıldığı metilmalonil-KoA mutaz enzimi ile izomerizasyonu ve bu reaksiyonun Folik asit metabolizmasından bağımsız olması, kobalamin eksikliğinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak MMA'nın önemini artırmıştır. Serum veya plazmada ölçülen MMA konsantrasyonu sıklıkla kobalamin eksiklik belirteci olarak kullanılır. Kobalamin eksikliğinden başka MMA artışına neden olarak bilinen, birçok klinik durum vardır. Bunlar arasında ön mide tembellikleri, bozulmuş böbrek fonksiyonları, dehidrasyon durumları, kalıtsal metilmalonik asidüriler ve MMA'nın öncül molekülü olan propiyonik asit üretimine neden olan ince bağırsaktaki aşırı bakteri üremesi yer almaktadır (Bolann ve ark. 2000).

Berghoff ve ark. (2012)'ları, farklı hastalıklara (sindirim sistemi hastalıkları, böbrek yetmezliği, dolaşım hastalıkları, anemi, dehidrasyon) sahip 555 köpekte kobalamin ve MMA serum konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaptıkları bir çalışmada; kontrol grubu (43 adet) köpeklerde ortalama serum metilmalonik miktarını 697.8 mmol/L, ortalama serum kobalamin konsantrasyonunu ise 539 ng/L olarak saptamışlardır. Araştırmacılar 555 köpeğe ait serum örneklerini serum kobalamin konsantrasyonlarına göre (<150 ng/L-1000 ng/L) gruplandırılmış olup, grup 1 ve 2'deki köpeklerin (sırasıyla kobalamin <150 ve <151-250 ng/L), diğer tüm köpek gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek serum metilmalonik konsantrasyonlarına (1328.0 ve 1033.0 mmol/L) sahip olduğunu (P<0.05) belirtmişlerdir. Kobalamin ve MMA arasında güçlü negatif bir korelasyonun (P<0.0001) olduğunu açıklamışlardır.

Bu çalışmada, kontrol grubu MMA miktarı en yüksek 76.65 µmol/L, en düşük 17.64 µmol/L olarak ölçülmüş olup ortalama değer 45.89±5.65 µmol/L olduğu görüldü. İndigestyonlu sığırlarda en yüksek MMA değeri 190.85 µmol/L iken en düşük değer 8.08 µmol/L olarak belirlendi

ve ortalama değerin 75.99±5.86 µmol/L olduğu ortaya konuldu. Dolayısıyla basit indigestiyonlu sığır grubunun MMA değerinin, kontrol grubundaki sığırlara göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edildi. MMA düzeyindeki bu yükseklik, sığırdaki basit indigestiyonun erken tanısı ve B<sub>12</sub> vitamin yetersizliği için anlamlı bir bulgu olduğunu ve indigestiyonların süresi ve şiddetini belirleme açısından önemli bir tanısal belirteç olabileceğini göstermektedir. B<sub>12</sub> vitamini yetmezliğinde serum MMA düzeyinin artışı bildiren araştırmacıların (Wintrobe ve ark. 1981; Schneede ve Ueland 1993; Berghoff ve ark. 2012; Akış 2012; Şenes 2013) bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

B<sub>12</sub> vitamini ve folik asit, hematopoetik hücrelerde, gastrointestinal, ürogenital ve sinir sisteminde DNA sentezi gibi oldukça önemli metabolik olaylarda rol alırlar. Eksikliklerinde ciddi ve farklı klinik bulgular görülür ve hızlı proliferasyon alan tüm dokular etkilenirler (Altay ve Çetin 1995; Öncel ve ark. 2006).

Normal büyüme ve eritrositlerin oluşumu için esansiyel bir vitamin olan B<sub>12</sub> vitaminini, monogastrik hayvanlar dışarıdan alabilirken ruminantlar kobalt varlığında rumende bulunan bakteriler (Selemonas, Peptostreptococcus ve Butyrivibrio grubu) tarafından sentezleyebilirler (İssi ve ark. 2010). Ancak basit indigestiyonlu sığırlarda rumen mikroflorası tahrip olduğundan, vitamin B<sub>12</sub> sentezlenmesi durur (George ve ark. 2006). Dolayısıyla kanda, doku ve organlarda yetersizliğe ve ilgili fonksiyonların işlevsiz kalmalarına sebep olur.

Sağlıklı sığırların serum vitamin B<sub>12</sub> düzeyinin 155.13±19.74 pg/mL olduğu bildirilmektedir (İssi ve ark. 2010). Yapılan başka bir çalışmada (Ertaş 2015) sağlıklı sığırların serum vitamin B<sub>12</sub> değeri 193.00±7.69 pg/mL olduğunu aktarmıştır. Ayrıca, sağlıklı simental, holştayn ve montefon ırkı sığırlarda yapılan bir başka çalışmada B<sub>12</sub> vitamini düzeyleri sırasıyla 192.36±22.02, 253.50±26.73, 183.74±22.22 pg/mL olarak ölçülmüştür (Kılıçkap 2012). Yapılan bu çalışmada kontrol grubunda vitamin B<sub>12</sub> düzeyi 207.20±13.51 basit indigestiyon grubunda ise 199.02±7.96 olarak ölçüldü. İndigestiyon grubunun, kontrol grubuna göre vitamin B<sub>12</sub> düzeyinin azaldığı görüldü de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P>0.05). Elde edilen bulgular araştırmacıların (İssi ve ark. 2010; Kılıçkap 2012; Ertaş 2015) bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda basit indigestiyonlu sığır gruplarında MMA ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin tanısal açıdan önemini ortaya konulması ve bu parametreler arasındaki korelasyon araştırıldı. Yapılan literatür taramasında, basit indigestiyonlu sığırlarda MMA ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Basit indigestiyon, sığırların sindirim sistemi tembelliklerinde serum MMA değerlerinin ortaya konulması açısından önemli ve yeni bir çalışmadır. Sığırlarda indigestiyonların süresi ve şiddetinin ortaya konması açısından bu parametrenin tanısal önemi değerlendirildi.

Bu çalışmada kontrol grubu sığırlar ile basit indigestiyonlu sığırlar arasında MMA düzeyleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak (P<0.05) önemli bulundu.

Basit indigestiyonlu sığırlarda MMA ve B<sub>12</sub> vitamin düzeyleri arasında 0.017 oranında negatif bir korelasyon olduğu saptandı.

Serum B<sub>12</sub> vitamin düzeyinin ölçülmesi, serumdaki B<sub>12</sub> vitamini miktarının bir göstergesi olmasına karşın, B<sub>12</sub> vitamininin metabolik fonksiyonları hakkında bilgi vermemektedir. Oysa B<sub>12</sub> vitamin eksikliğinde görülen, serum MMA ve homosistein yükseklikleri, B<sub>12</sub> vitamininin

fonksiyonel eksiklik belirteçlerindedir (Henk ve ark. 2007). B<sub>12</sub> vitamin eksikliğinin fonksiyonel belirteçleri olan MMA ve homosistein ise yetersiz B<sub>12</sub> vitamin konsantrasyonlarında birikmekte ve klinik belirti göstermeyen erken değişiklikleri yansıtmaktadır (Yetley ve ark. 2011). Ancak, homosistein B<sub>12</sub> vitamin eksikliği dışında folik asit ve B<sub>6</sub> vitamin eksikliklerinden de etkilenmesi nedeniyle MMA'ya göre daha az özgül bir metabolik biyobelirteçtir (Klee 2000; Akış 2012). Dolayısıyla B<sub>12</sub> vitamin eksikliği tanısının konulmasında, bu testin de kullanılması, tanıdaki hataları azaltacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle beşeri hekimlikte, serum veya idrar MMA düzeyleri ile homosistein düzeylerinin ölçümüne yönelik metotlar geliştirilmiştir. Dolaşımdaki MMA düzeyleri, kan B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu düşük olan insanlarda yararlı bir doğrulayıcı tanı testi olarak kabul edilmektedir. 20 yıldan daha fazla bir süredir serum/plazma ve idrarda MMA ölçümü B<sub>12</sub> vitamin eksikliğinin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Lakso ve ark. 2008).

Ancak, MMA veteriner hekimlik alanında tanısal amaçla kullanılması henüz çok yenidir. Veteriner hekimlik alanında MMA ilgili literatür bulmakta ciddi zorluklar vardır. Bu konu daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Elde edilen verilere göre; basit indigestiyonlu sığırların tanısında metilmalonik asidin biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin önemli olduğu saptandı. İndigestiyonlu sığırlarda MMA ile B<sub>12</sub> vitamin yetersizliği arasında negatif bir korelasyonun olduğu belirlendi. Serum B<sub>12</sub> vitamin düzeyleri azalırken, MMA düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Serum MMA düzeyi stabilitesinin daha uzun sürmesi ve özellikle de subklinik B<sub>12</sub> vitamin yetmezliği tanısında uygulanabilirliği, parametre açısından önemli bir avantaj olarak görülmektedir. Metilmalonik asit ölçümü, vitamin B<sub>12</sub> konsantrasyonu ölçümüne göre tanısal doğruluğu daha yüksek ve iyi bir belirteçtir. Kontrol grubunda bulunan sağlıklı sığırlarda serum MMA düzeyleri ortalama 45.89±5.65 olarak belirlendi. Sığırlardaki indigestiyonların şiddeti ve süresini ortaya koymak için vitamin B<sub>12</sub> yetmezliğine ilaveten serum metilmalonik asit düzeylerinin de tanısal öneme sahip olduğu ortaya konuldu.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Başkanlığı tarafından TYL-2017-6163 nolu proje olarak desteklenmiştir. 13. Ulusal 2. Uluslararası Veteriner İç Hastalıkları Kongresinde sözlü olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

## YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: VB, AK

Tasarım: VB, AK

Denetleme/Danışmanlık: VB, AK

Veri Toplama ve/veya İşleme: VB, AK

Analiz ve/veya Yorum: VB, AK

Kaynak Taraması: VB, AK

Makalenin Yazımı: VB, AK

Eleştirel İnceleme: VB, AK

## KAYNAKLAR

- Akış M (2012).** Sağlıklı ve fenilketonüri çocuklarda fonksiyonel B<sub>12</sub> vitamin eksikliğinin plazma metilmalonik asit ve homosistein düzeyleri ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Altay Ç, Çetin M (1995).** Megaloblastik anemiler. *Katki Pediatri Dergisi*, 3, 346-362.
- Altınsoy Ç (2001).** Akkaraman koyunlarda B12 vitamini ve folik asit düzeyleri ile bazı hematolojik ve biyokimyasal değerler arasındaki ilişki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 48, 141-145.
- Altuğ N (2014).** Sığırlarda basit indigestyon. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 5(3), 7-14.
- Aygün F, Zübarioğlu T, Aygün D, Zeybek ÇA, Çam H (2015).** Geç tanı alan metilmalonik asidemi vakası. *Çocuk Dergisi*, 15(1), 38-40.
- Aytuğ CN, Alaçam E, Görgül S, Gökçen H, Tuncer ŞD, Yılmaz K (1991).** Sığır Hastalıkları. Genişletilmiş 2. Baskı, Tüm Vet Hayvan Hizmetleri (Yay No:3), İstanbul.
- Balıkçı E, Yılmaz K (1999).** Investigations on the importance of blood electrolytes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>++</sup>, Inorganic P and Mg<sup>++</sup>) and electrocardiogram findings in diagnosis and prognosis of some forestomach diseases in cattle. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 13(3), 349-58.
- Başoğlu A (1998).** Veteriner İç Hastalıklarında Klinik Muayene. Bahçıvanlar Basım, Konya.
- Batmaz H (2010).** Sığırlarda İç Hastalıkları, Semptomdan Tanıya, Tanıdan Sağaltıma. Genişletilmiş 2. Baskı, F Özsan Matbaacılık, Bursa.
- Berghoff N, Suchodolski JS, Steiner JM (2012).** Association between serum cobalamin and methylmalonic acid concentrations in dogs. *The Veterinary Journal*, 191, 306-311.
- Bingöl G (1997).** Vitaminler ve enzimler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları, Ankara.
- Bolann BJ, Solli JD, Schneid J, et al. (2000).** Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamin-induced reduction in increased serum methylmalonic acid. *Clin Chem*, 46(11), 1744-1750.
- Constable PD (2010).** Simple Indigestion In: The Merck Veterinary Manual, Kahn CM, Line S (Ed), 199-200, Merck&Co Inc, Indiana.
- Dabak M (2009).** The investigation of methylene blue reduction time of ruminal fluid in some forestomach diseases of cattle. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 23(1), 53-55.
- Dodurka T (2012).** Sindirim Sistemi İç Hastalıkları. <http://cdn.istanbul.edu.tr/FileHandler2.ashx?f=sindirim-sistemi-ic-hastaliklari.pdf> Erişim Tarihi: 25.12.2017.
- Elin RJ, Winter WE (2001).** Methylmalonic acid: a test whose time has come? *Archives of pathology & laboratory medicine*, 125(6), 824.
- Ertaş F (2015).** İndigestyonlu sığırlarda bazı mineral madde ve vitamin düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Foster DM (2013).** Simple indigestion, rumen acidosis and non-infectious diarrhea in adult cattle. In: Proceedings 2013 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, New York State College of Agriculture and Life Sciences, East Syracuse, New York.
- Garry FB (2009).** Rumen İndigestion and Putrefaction, In: "Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice". Anderson DE, Rings DM (Ed), 20-21, Saunders&Elsevier, Missouri, ABD.
- Gebarski SS, Gabrielsen TO, Knake JE, Latack JT (1983).** Cerebral CT findings in methylmalonic and propionic acidemias. *Am J Neuroradiol*, 4, 955-957.
- George SK, Dipu MT, Mehra UR, Singh P, Verma AK, Thomas R (2006).** Efficacy of Chlorpheniramine Maleate and B-Complex Vitamins in the Clinical Management of Simple Indigestion in Crossbred Cattle. *Intas Polivet*, 7(1), 8-9.
- Graham IM, O'Callaghan P (2002).** Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drug Ther*, 16, 383-389.
- Gül Y (2012).** Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun-Keçi). Medipres Matbaacılık, Malatya.
- Henk J. Blom AvR, Marije, Hogeveen (2007).** A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*, 45(5), 645-650.
- Herdth TH (2007).** Gastrointestinal Physiology and Metabolism In: Textbook of Veterinary Physiology, Cunningham JG, Klein BG (Ed), Saunders&Elsevier, Missouri.
- İmren H.Y. (1978).** Sığırlarda Sindirim Bozukluklarında Rumen İçeriğinin Tetkiki ve Tedavideki Rolü. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- İmren HY, Şahal M (1991).** Veteriner İç Hastalıkları, 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- İspir E (2012).** Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi ile serum metilmalonik asit tayini ve serum B12 vitamini, serum homosistein düzeyleriyle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Gülhane Askeri Akademi Askeri Tıp Fakültesi, Ankara.
- İssi M, Gül Y, Başbuğ O, Şahin N (2010).** Tropikal theileriozisli sığırlarda klinik, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler ile serum kobalt ve B<sub>12</sub> vitamin düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(6), 909-913.
- Kılıçkap A (2012).** Sağlıklı kültür ırkları ineklerde serum homosistein düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Klee GG (2000).** Cobalamine and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocystein vs vitamin B<sub>12</sub> and folat. *Clin Chem*, 46, 1277-1283.
- Lakso HA, Appelblad P, Schneede J (2008).** Quantification of methylmalonic acid in human plasma with hydrophilic interaction liquid chromatography separation and mass spectrometric detection. *Clin Chem*, 54, 2028-2035.
- Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P (2000).** Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 46, 1804-1810.
- Öncel K, Özbek MN, Onur H, Söker M, Ceylan A (2006).** Diyarbakır ilindeki çocuklarda ve adolesanlarda B<sub>12</sub> vitamin ve folik asit düzeyleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 33(3), 163-169.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007).** Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses, 10<sup>th</sup> Ed. Saunders&Elsevier, Philadelphia.
- Schneede J, Ueland PM (1993).** Automated assay of methylmalonic acid in serum and urine by derivatisation with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography and fluorescence detection. *Clin Chem*, 39(3) 392-399.
- Sekin S, Voyvoda H, Ağaoğlu ZT, Karaca M (1996).** The general evaluation of the diseases of the animals brought to the internal clinic of the Veterinary College in Yüzüncü Yıl University from Van and its region during 1992-1997 years. *YYU Vet Fak Derg*, 7(1-2), 106-109.
- Smith BP (2009).** Large Animal Internal Medicine, 4<sup>th</sup> Ed. Mosby-Elsevier, Missouri.
- Smith EL, Fantes KH, Ball S, Waller JG (1952).** B<sub>12</sub> vitamins (cobalamins). I. Vitamins B<sub>12c</sub> and B<sub>12d</sub>. *Biochem J*, 52, 389-395.
- Şeneş M (2013).** Migren ve gerilim tipi baş ağrısında vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit eksikliğinin önemi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Şimşek A, Kaya A (2007).** Van ili ve çevresinde 2000-2003 yılları arasında görülen hastalıkların insidansı ve mevsimlere göre dağılımı üzerine araştırmalar. *YYU Vet Fak Derg*, 18(2), 59-64.
- Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR (1981).** Megaloblastic Anemias Disorders Of Impaired DNA Synthesis In: Clinical Hematology, 8th ed. Lea and Febiger (Ed), 559-604, Philadelphia.
- Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL (2011).** Biomarkers of vitamin B<sub>12</sub> status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr*, 94, 313-321.



## Clinical Studies on the Distribution and Treatment of Hind Limb Traumatic Lesions in Cats

Mehmet SAĞLAM<sup>1,\*</sup> Hasan Mertcan TABAN<sup>2</sup> Abdurrahim FADIL<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Ankara University, Health Sciences Institute, Ankara, Turkey.

Received: 20.02.2021

Accepted: 08.03.2021

### ABSTRACT

In this study, 20 cats of different breeds, ages and genders with traumatic lesions in the hind limbs that were brought to the Clinic of Surgery, Animal Hospital Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University were evaluated. Clinical examination and radiological examination were performed in the bones of the hind limbs. According to these findings, fractures in 13 cases, coxal joint luxation in 2 cases, tarsal joint luxation in 2 cases and open wound in 3 cases were detected and necessary post-operative controls were maintained. Systemic examinations of the cases were performed according to the anamnesis and inspection findings. The related extremity was examined for pain, temperature, swelling, deformity, abnormal movement, crepitation and asymmetry. Using support bandages or restriction of the area were sufficient in non-displaced fractures. Maintenance and control procedures were routinely performed in patients undergoing conservative treatment as well. Successful results were obtained in the treatment of lesions requiring open reduction and fixation. In conclusion, general description, causes and localization of the traumatic lesions in the hind limbs of cats and the indicated treatment of the clinical cases and along with their results, as well as detailed information about the treatment methods were presented in this study. Besides, postoperative complications were also reported. As a result, it is believed that this study will provide a guiding contribution to clinical applications.

**Keywords:** Cat, ekstremitte, trauma, treatment

### öz

### Kedilerde Arka Ekstremitte Travmatik Lezyonlarının Dağılımı ve Sağaltımı Üzerine Klinik Çalışmalar

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Kliniğine getirilen, arka ekstremitelerinde travmatik lezyonlar bulunan farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki 20 kedi değerlendirildi. Olgularda gerçekleştirilen klinik ve radyolojik muayeneler sonrasında; 13 olguda arka ekstremiteleri kemiklerinde kırık, 2 olguda caput femoris lüksasyonu, 2 olgu'da art. tarsi lüksasyonu, 3 olgu'da açık yara şekillenmiş olup, endike olan sağaltımları gerçekleştirilerek postoperatif kontroller sürdürülmüştür. Olguların anamnezleri ve inspeksiyon bulgularına göre sistemik muayeneleri gerçekleştirildi. Lezyon belirlenen ekstremitte ağrı, sıcaklık, şişkinlik, deformite, anormal hareket, krepitasyon ve diğer ekstremitesi ile asimetri bulguları yönünden muayene edildi. Konservatif sağaltım endikasyonu bulunan kırıklarda destekli bandaj ve kısıtlı alan uygulamaları yeterli olup, rutin bakım ve kontrolleri sürdürüldü. Açık redüksiyon ve fiksasyon gerektiren olgularda endike olan sağaltım yöntemleri ve postoperatif rutin kontrolleri sürdürülerek fonksiyonel iyileşmeleri sağlandı. Klinik olguların değerlendirildiği bu çalışmada, kedilerde karşılaşılan arka ekstremitte travmatik lezyonlarının genel olarak tanımı, oluşum nedenleri, lokalizasyonu ile endike olan konservatif veya operatif sağaltım yöntemlerinin uygulanmasına ilişkin ayrıntılı bilgiler aktarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ekstremitte, kedi, sağaltım, travma

### GİRİŞ

Travmatik etkenler bir hayvanda birtakım değişiklikler, yaralanma ya da ölüm oluşturabilecek bulunduğu çevre kaynaklı herhangi bir etki ya da kuvvet olarak tanımlanmaktadır. Geniş anlamda; gelecekte ortaya çıkabilen bir hastalık için zemin yaratan, stres oluşturan ya

da fonksiyon bozukluklarına sebep olabilecek indirekt çevresel faktörler (örneğin, fiziksel, kimyasal faktörler) olarak tanımlanır (Kolata 1980; Selcer ve ark. 1987).

Travma yaratan direkt etkili birçok faktör bildirilmiştir. Bu faktörler ayrı ayrı değerlendirildiği gibi, birçoğunun beraber incelendiği bilimsel çalışmalar da yapılmıştır.

\*Corresponding author: [saglam45@gmail.com](mailto:saglam45@gmail.com)

This research article was summarized from the second author's master thesis.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

Travmatik bir lezyon oluşturan en önemlisi de trafik kazalarıdır. Sonra sırasıyla bilinmeyen nedenler, hayvanların birbirleriyle olan kavgaları ve diğer faktörler gelir (Kolata ve Johnston 1975; Schebitz ve ark. 1983; Swaim 1985).

Kolata ve ark. (1974)'na göre travmatik etkenler; trafik kazaları, hayvanların birbirleriyle olan kavgaları, kesici ya da sivri cisim yaralanmaları, ateşli silah ile yaralanmalar, yanıklar, ezilmeler, düşmeler, insanların sebep olduğu lezyonlar ve bilinmeyen nedenler olarak 9 gruba ayrılır. Daha az oranda karşılaşılan direkt etkenler ise; farklı patlayıcıların sebep olduğu travma, donma, güneş çarpması, boğulma, elektriksel etkenler ve lineer ya da non-lineer gastro-intestinal yabancı cisimler etkileridir. Diğer önemli direkt travmatik etkenler ise; endüstriyel, tarımsal, ev ve bahçede günlük kullanılan kimyasal maddelerle hayvanların temas durumudur.

Cinsiyetin de travma için bir risk faktörü olduğu tanımlanmaktadır. Erkeklerin dişilere göre daha gezgin olmalarıyla, kavga riskinin bulunmasıyla travmatik etkilenmelerinin daha çok olduğu belirtilmektedir. Dişilerin çoğunlukla ev ortamında kalmasıyla; düşme, ezik ve yanık gibi vakalar gözlenir. Yaş faktörü olarak, gençlerin yaşlılara göre daha aktif olmalarıyla travma ile karşılaşma ihtimallerinin fazla olduğu vurgulanmıştır (Kolata ve ark. 1974).

Kedilerde ekstremitelerin farklı travmatik lezyonlarına rastlanmaktadır (Slatter 2003). Bu travmatik lezyonlar içinde en sık kırık oluşumlarıyla karşılaşılır. Yumuşak dokular için genellikle ezilme, kesik yarası, sivri ve batıcı cisim yaraları, ısırık ve ateşli silah yaraları, yanık oluşu, yalama ile oluşan granülomlar diğer karşılaşılan lezyonlardır. Çoğunlukla art. coxae'da olmak üzere diğer eklemlerde oluşan travmatik luksasyonlar, LCA (lig. cruciatum anterior) rupturu, derin ya da perfore eklem yaralanmaları da karşılaşılan diğer travmatik lezyonlardır (Kolata ve ark. 1974).

Yapılan bir çalışmada, travmatik lezyonların dağılımı; kırık oluşumu %49, değişik yaralar %17, çıkıklar %7, medulla spinalis ve perifer sinir lezyon oluşumları %6, kontüzyonlar %5, otitis externa %3, fistül %2, ateşli silah yaralanması %1, LCA rupturu %0,7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, kedilerde karşılaşılan travmatik lezyonların risk faktörünün, öncelikle bu kedilerin insan denetiminde olmaması, yaş ve cinsiyet olduğu belirlenmiştir (Kolata 1980).

Travmatik kırıklar, etkileyen kuvvetin şiddeti ve bunları absorbe edebilme gücüne göre; küçük bir çatlak, bir ya da birden fazla kemikte kırık oluşumu, bunlara komşu eklemlerde çıkık oluşumuna (kırıklı çıkık) kadar değişikgenlik gösterebilir. Kırık oluşturan kuvvet; sadece kemikte kırık oluşturmayıp, kemik çevresindeki deri, kas, damar, tendo, ligament, sinir ve komşu doku ve organları da yaralayabilir (Kenneth ve Joseph 2004; Us 2004).

Arka ekstremitelerde kemiklerindeki kırıkların sağaltımında; genellikle bandaj uygulamaları, konservatif sağaltım, internal ve eksternal fiksator uygulamalarıyla redüksiyon ve fiksasyon gerçekleştirilir (Scott ve Mc Laughlin 2007).

Eklemin destek yapılarının değişik lezyonları sonucunda luksasyon şekillenebilir ve ilgili ekstremitede fonksiyonel bozukluğa sebep olur. Ligamentler eklemin primer destekleri olup, eklem kapsülü, tendolar ve kaslar da sekonder destekler olarak katkı sağlarlar. Luksasyon oluşan eklemlerde, eklemin normal lubrikasyonu ve eklem kıkırdağın fizyolojik beslenmesi bozulur. Ayrıca, luksasyon nedeniyle karşılıklı olmayan eklem yüzeylerine binen

ağırlık, eklem kıkırdağında da lezyon oluşturur (Harrari ve ark. 1996; Aslanbey 2002).

LCA rupturu yalnız köpek ve kediler için değil, insanlar için de çok sık görülen bir lezyondur (Piermettei ve Flo 1997). Aniden olan internal rotasyon, trafik kazaları, kediler koşarken bir anda alçak zemine düşmeleri, LCA vasküler bozukluğu, fossa intercondylaris'in anatomik yönden dar yapıda oluşu, vücut ağırlığının fazla oluşu, kedinin aşırı hareketliliği, operasyonlar, arka ekstremitenin duruş bozukluğu ve fiziksel kondüsyon bozuklukları nedenler arasındadır (Piermettei ve Flo 1997; Slatter 2003). İnceleme, oturma testi, öne çekmece ve arkaya çekmece hareket testleri, tibial kompresyon testi, genu varum ve genu valgus stres testi, radyolojik yönden çeşitli test ve muayeneler ile tanı gerçekleştirilir (Slatter 2003). LCA rupturunun sağaltımındaki operatif yöntemlerin farklılığına rağmen, temel prensip olan eklem stabilitesini yeniden sağlamak düşüncesi değişmemektedir (Sağlam ve Kaya 2000).

Veteriner cerrahide oldukça fazla karşılaşılan travmatik lezyonların; kedilerde arka ekstremitelerinde şekillenen lezyonların dağılımı, bunları oluşumunda belirlenen farklı travmatik etkiler ve oluşan lezyonların endike olan sağaltım seçenekleri ile sonuçlarının aktarılması ile bu konuda çalışan veteriner hekim klinisyenler için yönlendirici olması ve benzer çalışmalarda katkı sağlaması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Araştırmanın gereç ve yöntemi Ankara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2019-4-40, Tarih: 06.02.2019).

Çalışma materyalini Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Kliniği'ne arka ekstremitelerde travması nedeniyle getirilen, değişik yaş (4 ay-3 yaş), ırk ve cinsiyetteki 20 kedi oluşturmuştur.

Yapılan klinik ve radyolojik muayeneler sonucunda, 13 olguda arka ekstremitelerde kemiklerinde kırık, 2 olguda caput femoris'de luksasyon, 2 olguda art. tarsi'de luksasyon, 3 olguda açık yara belirlenmiştir. Travmatik lezyonların sağaltımları konservatif veya endike olan operatif yöntemlerle gerçekleştirilmiş, postoperatif kontrolleri sürdürülmüştür. Olgulara ait klinik bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

Klinik ve radyolojik muayeneler için gerektiğinde medetomidine HCl (Domitor, Voetis) ve xylazine HCl %2 (Rompun® 23,32 mg/ml, Bayer) ile yeterli sedasyon sağlanmıştır. Operatif sağaltım endikasyonu bulunan olgular için, xylazin HCl %2 (Rompun® 23,32 mg/ml, Bayer) 0,1 ml/kg dozunda intramusküler uygulanmasıyla sağlanan premedikasyon sonrasında, ketamin HCl %10 (Ketasol® 100 mg/ml, Richterpharma) 0,1 ml/kg dozunda intramusküler uygulanarak genel anestezi sağlandı. Operasyon bölgesi kapatıldıktan sonra, lokal antibiyotik olarak 3-5 mg/kg dozunda rifamycin (Rifosin® 250 mg/ml, Avebtis) uygulandı. Daha sonra bölge bandaj uygulamasıyla korundu. Gerektiğinde Elizabeth yakalığı kullanıldı. Postoperatif analjezi sağlamak amacıyla meloksikam (Metacam 0,5mg/ml, Boehringer-İngelheim) kullanılmıştır.

Sağaltım amaçlı şırıjikal girişimlerde rutin olan operasyon setleri kullanıldı. Kırık oluşumlarının sağaltımında değişik çaplarda Kirschner ve Steinmann pinleri, lag vidası ile 0.8'lik serklaj teli kullanılmıştır.

**Tablo 1.** Olgularda ırk, yaş, cinsiyet, lezyonu oluşturan neden, lezyonun yeri ve uygulanan sağaltıma göre dağılım.**Table 1.** Distribution of cases according to breed, age, sex, cause of the lesion, location of the lesion and treatment applied.

Olgu no	İrk	Yaş (Ay)	Cinsiyet	Travmatik neden	Oluşan lezyon ve lokalizasyonu	Uygulanan sağaltım
1	Melez	4	Erkek	Küt Travma	Sağ collum femoris kırığı	Eksizyon artroplastisi
2	Melez	8	Dişi	Sıkışma	Sağ caput femoris luksasyonu	Eksizyon artroplastisi
3	Melez	12	Erkek	Bilinmiyor	Sağ femur'da diyafizer parçalı kırık	İM pin ve serklaj teli uygulaması ile osteosentez
4	Melez	12	Dişi	Küt travma	Sağ femur'da diyafizer parçalı kırık	İM pin ve serklaj teli uygulaması ile osteosentez
5	Melez	12	Dişi	Trafik kazası	Sol femur'da epifizer kırık	Armstead-lumb ve çapraz pin yöntemi ile osteosentez
6	Tekir	9	Erkek	Yüksekten düşme	Sol femur'da epifizer kırık	Çapraz pin yöntemi ile osteosentez
7	Tekir	8	Dişi	Küt travma	Sol caput femoris'de avülsiyon ve trochanter major kırığı	Kirshner pini ve germe teli uygulaması ile osteosentez
8	Melez	10	Dişi	Yüksekten düşme	Sağ femur'da suprakondiler kırık	Çapraz rush pini ve çapraz Kirschner teli uygulaması ile osteosentez
9	Siyam	24	Erkek	Yüksekten düşme	Sağ ve sol tarsal kemiklerde kırık	İM pin uygulaması ile osteosentez
10	Van	18	Dişi	Bilinmiyor	Sol tibia'da diyafizer parçalı kırığı	İM pin ve serklaj teli uygulaması ile osteosentez
11	Ankara	7	Dişi	Yüksekten düşme	Sol femur'da suprakondiler ve intrakondiler kırık	İnterkondiler lag vidası ve çapraz pin ile osteosentez
12	Melez	9	Erkek	Küt travma	Sol tibia ve fibula'da diyafizer kırık	İM pin uygulaması ile osteosentez
13	Ankara	36	Dişi	Yüksekten düşme	Sol art. tarsi luksasyonu	Bandaj uygulaması
14	Melez	9	Erkek	Bilinmiyor	Sağ tibia'da açık yara	Açık yara sağaltımı
15	Melez	12	Erkek	Küt travma	Sağ femur'da diyafizer parçalı kırık	İM pin ve serklaj teli uygulaması ile osteosentez
16	Melez	8	Erkek	Küt travma	Sağ art. tarsi luksasyonu	Bandaj uygulaması
17	Melez	24	Dişi	Yüksekten düşme	Sağ tibia'da diyafizer açık kırık	İM pin uygulaması ile osteosentez
18	Melez	12	Dişi	Bilinmiyor	Sol tibia'da açık yara	Açık yara sağaltımı
19	Tekir	12	Erkek	Bilinmiyor	Sol caput femoris luksasyonu	Bandaj uygulaması
20	Melez	12	Dişi	Sivri cisimle kesik	Sol tarsal bölgede açık yara	Açık yara sağaltımı

Arka ekstremitelerin travmatik lezyonları şikâyeti ile getirilen olguların anamnezleri ve inspeksiyon bulgularına göre klinik muayeneleri yapıldı. Lezyon belirlenen ekstremitelerde deformasyon, şişkinlik, sıcaklık, ağrı, anormal hareket, krepitasyon ve karşıtı ekstremitelerde asimetri belirtileri yönünden muayene edildi. Klinik muayenelerden sonrası gerekli olan olgularda özel pozisyonlarda radyografileri alınarak klinik tanı kesinleştirildi.

#### Sağaltım

Belirlenen lezyonlar için endike olan operatif sağaltımlar, olguların sağlanan sedasyon ve genel anestezi sonrası, operasyon masasına alınmasıyla ilgili bölgenin operatif sağaltımı için rutin hazırlığı yapıldı. Konservatif sağaltım endikasyonu bulunan olgularda gerekli olan destekli bandaj uygulaması 15. günde uzaklaştırılarak, klasik kafes uygulaması 2 hafta daha sürdürülmüştür. Daha sonra klinik ve radyolojik kontrolleri yapılmıştır.

#### Caput Femoris Luksasyonunda Kapalı Redüksiyon

Kalça eklemine kapalı redüksiyonu için olgu no 19 genel anestezi altında ilgili ekstremitede üste gelecek şekilde lateral pozisyonunda operasyon masasına alındı. Bir el genu eklemine fleksiyonda medialden tesbit edecek şekilde, diğer elle trochanter major üzerinde basınç uygulamasıyla caput femoris acetabulum üzerine getirildi. Caput femoris acetabular kenar üzerinden kaydırıldığında, redüksiyonu gerçekleştirmek amacıyla ekstremitenin medial rotasyonu birlikte gerçekleştirilerek redüksiyon sağlandı. Alınan radyografi ile redüksiyon doğrulandı. Genu eklemi fleksiyonda iken trochanter major üzerinden basınç yaratacak şekilde yapılan bandaj uygulaması 14. günde uzaklaştırıldı.

#### Eksizyon Artroplastisi

Caput femoris luksasyonu belirlenen 2 olguda (olgu no 1 ve 2) (Şekil 1) eksizyon artroplastisi gerçekleştirildi. Genel anestezi altında kalça eklemine craniolateral yaklaşım uygulandı. Trochanter major medial yüzünden başlayarak ve trochanter tertius proksimal yüzüne kadar osteotomi

(osteotomi hattı transversal eksene dik olarak) gerçekleştirildi. Collum femoris bölgeden uzaklaştırıldı. Operasyon sonrası ilgili ekstremitede uygulanan bandaj, deri dikişlerinin 12. günde alınmasıyla uzaklaştırıldı.

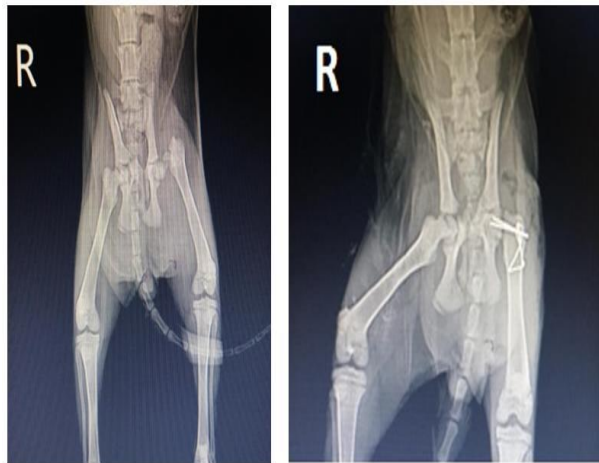


**Şekil 1.** Olgu no 2'de sağ caput femoris'te oluşan luksasyonun V/D radyografisi.

**Figure 1.** Case 2 V/D radiography of luxation in the right caput femoris.

#### Femur Kırıkları

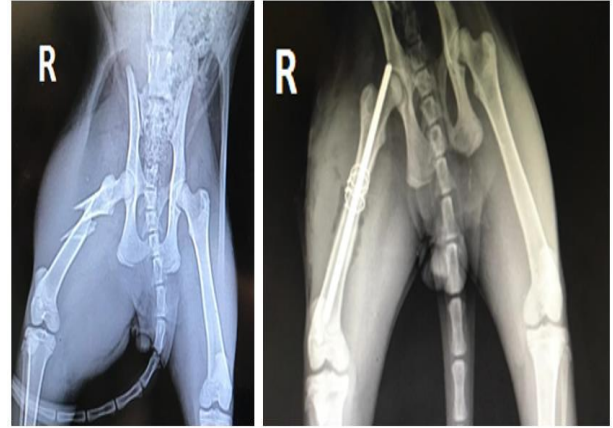
Collum femoris ve trochanter major kırığı olan bir olguda (olgu no 7) Kirshner pini ve germe teli ile osteosentez gerçekleştirildi (Şekil 2). Bölge rutin uygulama ile kapatıldı. Operasyon sonrası uygulanan destekli bandaj, 10. günde deri dikişlerinin alınmasıyla tekrarlanarak 3. hafta sonunda uzaklaştırıldı.



**Şekil 2.** Olgu no 7'de sol caput femoris avülsiyon ve trochanter major kırığı ve postoperatif Kirshner teli ve germe teli uygulamasının A/P radyografileri.

**Figure 2.** Case 7 A/P radiography of left caput femoris avulsion and trochanter major fracture and Postoperative A/P radiography of Kirshner and tension wire combination application.

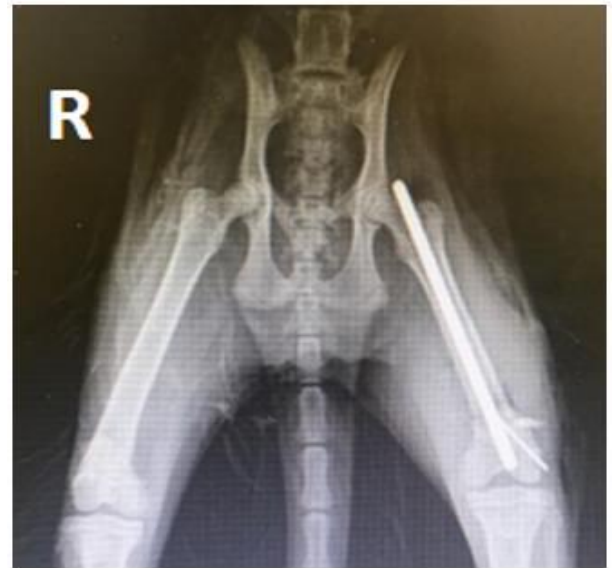
Femur'da diyafizer parçalı kırık belirlenen 3 olguda (olgu no 3, 4, 15) açık redüksiyon sonrası intramedullar pin ve serklaj telleri uygulamasıyla fiksasyon sağlandı (Şekil 3). Uygulanan pinin ekleme penetrasyonu yönünden kontrol edildi. Bölge rutin yöntemlerle kapatıldıktan sonra uygulanan destekli bandaj, 10. günde deri dikişlerinin alınmasıyla tekrarlanarak 3. hafta sonunda uzaklaştırıldı.



**Şekil 3.** Olgu no 4'de sağ femurda oluşan diyafizer parçalı kırık ve postoperatif İM pin ve serklaj teli uygulamasının A/P radyografileri.

**Figure 3.** Case 4 A/P radiography of the diaphyseal fracture of the right femur and Postoperative A/P radiography of IM pin and cerclage wire combination application.

Femur'da epifizer kırık belirlenen olgu no 5'de Armstead-Lumb ve çapraz pin yöntemi ile redüksiyon sonrasında fiksasyon sağlandı (Şekil 4).



**Şekil 4.** Olgu no 5'in Armstead-Lumb ve çapraz pin ile fiksasyonu gerçekleştirilen epifizer femur kırığının postoperatif A/P radyografisi.

**Figure 4.** Case 5 Postoperative A/P radiography of the epiphyseal femur fracture fixed by Armstead-Lumb and cross pin combination.

Suprakondiler femur kırığı belirlenen olgu no 8'de çapraz rush pini ve çapraz Kirschner teli uygulamasıyla kırığın fiksasyonu sağlandı. Bölge uygun yöntemlerle kapatıldıktan sonra uygulanan destekli bandaj, 10. günde deri dikişlerinin alınmasıyla tekrarlanarak 3. hafta sonunda uzaklaştırıldı.

Suprakondiler ve intrakondiler kırık belirlenen olgu no 11'de redüksiyonu sağlamak için çapraz rush pini ve lag vidası uygulandı (Şekil 5). Bölge uygun yöntemlerle kapatıldıktan sonra uygulanan destekli bandaj, 10. günde deri dikişlerinin alınmasıyla tekrarlanarak 3. hafta sonunda uzaklaştırıldı.



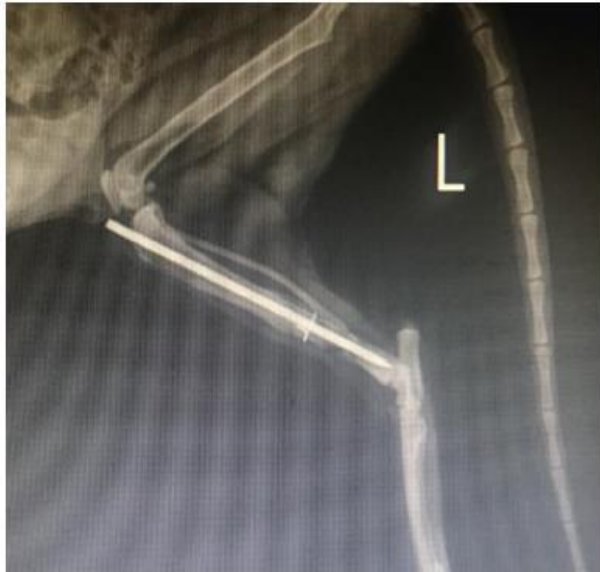


**Şekil 5.** Olgu no 11'de çapraz Rush pini ve lag vidası ile gerçekleştirilen suprakondiler Y kırığının postoperatif A/P radyografisi.

**Figure 5.** Case 11 Postoperative A/P radiography of supracondylar Y fracture performed with crossed Rush pin and lag screw combination.

#### Tibia Kırıkları

Diyafizer tibia kırıklarında (olgu no 10, 12, 17) tibia'nın medial yüzünden operatif yaklaşım gerçekleştirildi. Kırık uçlarında gereken düzeltmeler yapıldıktan sonra, retrograd yöntemle uygulanan intramedullar pin ve serklaj teli ile fiksasyon gerçekleştirildi. Bölge kapatıldıktan sonra da ilgili ekstremitte 3 hafta destekli bandajla korundu.



**Şekil 6.** Olgu no 10'da İM pin ve serklaj teli uygulamasıyla gerçekleştirilen diyafizer tibia kırığının postoperatif M/L radyografisi.

**Figure 6.** Case 10 postoperative M/L radiography of the diaphyseal tibia fracture performed with IM pin and cerclage wire combination application.

#### Art. Tarsi Luksasyonu

Art. tarsi luksasyonu olan iki olguda (olgu no 13, 16) distan koaptasyon uygulandı. Bölge 4-6 hafta boyunca destekli bandaj ile korundu. Hareket kısıtlaması önerildi.

#### Tarsal Kırık

Tarsal kırık belirlenen olgu no 9'da İM pinin anterograd uygulanması ile fiksasyon gerçekleştirildi (Şekil 7). Bölge

kapatıldıktan sonra ilgili ekstremitte 3 hafta destekli bandajla korundu. Kedinin aktivitesi kısıtlandırıldı.



**Şekil 7.** Olgu no 9'da sağ ve sol tarsal kemiklerdeki oluşan kırık ve postoperatif İM pin ve serklaj teli uygulaması ile gerçekleştirilen A/P radyografileri.

**Figure 7.** Case 9 A/P radiography of the fracture in the right and left tarsal bones and Postoperative A/P radiography of tarsal bone fractures performed with IM pin and cerclage.

#### Açık Yara

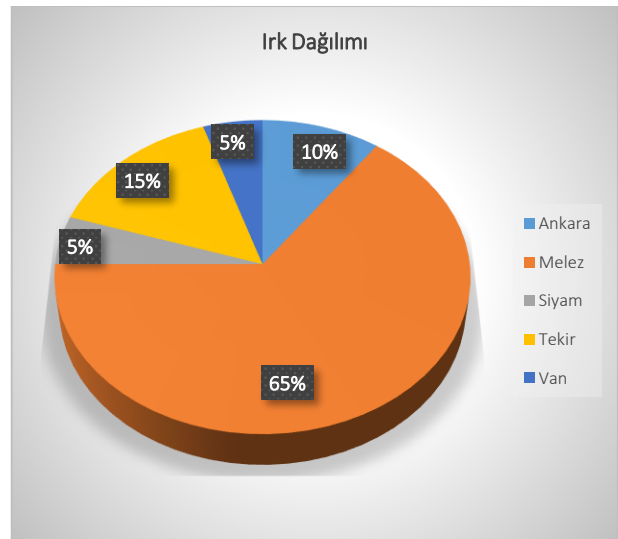
Açık yara şekillenmiş olan 4 olguda (olgu no 14, 17, 18, 20) açık yara sağaltımı gerçekleştirildi. Bunun için kanamanın kontrolü ve olası kontaminasyonu önlemek amacıyla yapılan yara sağaltımı sonrası pansumanla korundu. İyileşmenin daha çabuk olması amacıyla yara dudakları yaklaştırılarak dikiş uygulaması yapıldı. Bölge kuru pansumanla korunarak enfeksiyon riskine karşılık 5-7 gün süreyle parenteral antibiyotik uygulandı.

## BULGULAR

### Olgularda Irk, Cinsiyet, Yaş ve Travma Oluşturan Nedene Göre Dağılım

Çalışmayı oluşturan 20 kediye travmaya bağlı arka ekstremitte lezyonlarının nedeni lokalizasyonu ile birlikte olası diğer lezyonlar ve bu lezyonların endike olan yöntemlerle sağaltımı gerçekleştirilerek, sonraki iyileşme durumları ile oluşan komplikasyonlar değerlendirildi.

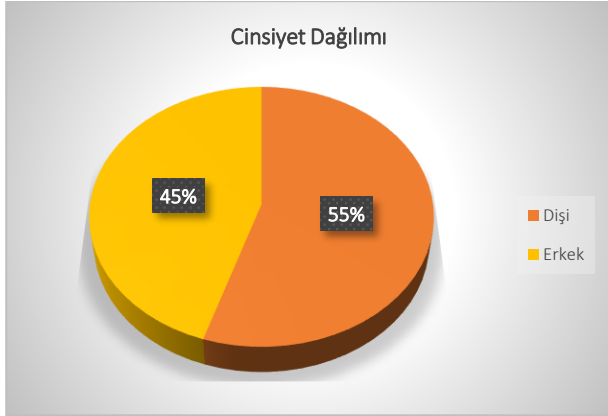
Çalışma materyalini oluşturan 20 kedinin ırk dağılımında; 13 olgunun melez, 3 olgunun Tekir, 2 olgunun Ankara, 1 olgunun Siyam ve 1 olgunun da Van Kedisi olduğu saptandı (Şekil 8).



**Şekil 8.** Olguların ırk dağılımı.

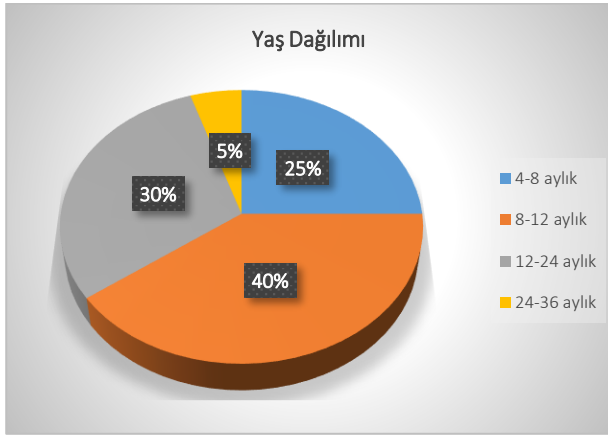
**Figure 8.** Breed distribution of the cases.

Olguların cinsiyet dağılımının ise; 9 erkek ve 11 dişi kedi olduğu belirlendi (Şekil 9). Çalışmada kullanılan kedilerin yaş dağılımının da 5 kedinin 4-8 aylık, 8 kedinin 8-12 aylık, 6 kedinin 12-24 aylık ve 1 kedinin 24-36 aylık yaş aralığında olduğu belirlendi (Şekil 10). Olguların medyanı 12 aylık olarak hesaplanmıştır.



Şekil 9. Olguların cinsiyet dağılımı.

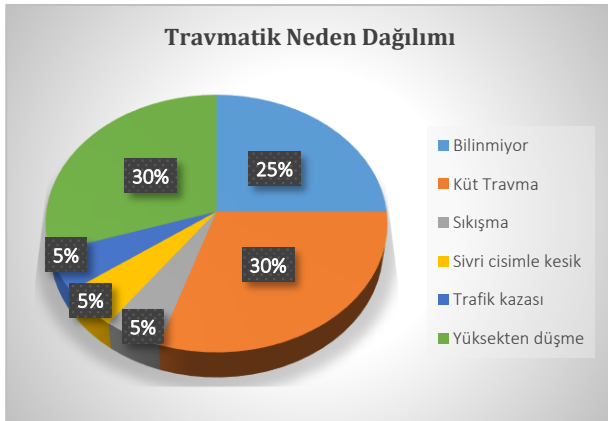
Figure 9. Gender distribution of the cases.



Şekil 10. Olguların yaş dağılımı.

Figure 10. Age distribution of the cases

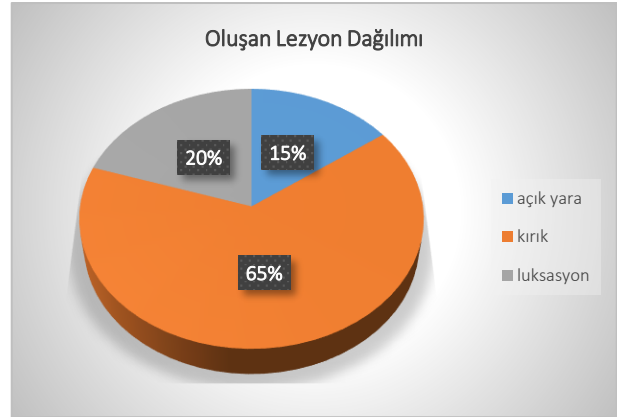
Lezyon oluşturan travmatik nedenlerin dağılımda; 6 olgu'da yüksekten düşme (%30), 6 olgu'da küt travma (%30), 1 olgu'da trafik kazası (%5), 1 olgu'da sıkışma (%5), 1 olgu'da sivri cisimle kesik (%5) etken olurken, 5 olgu'da (%25) lezyonu oluşturan neden belirtilmemiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Olgularda lezyon oluşturan travmatik nedenlerin dağılımı.

Figure 11. Distribution of traumatic causes causing lesions in cases.

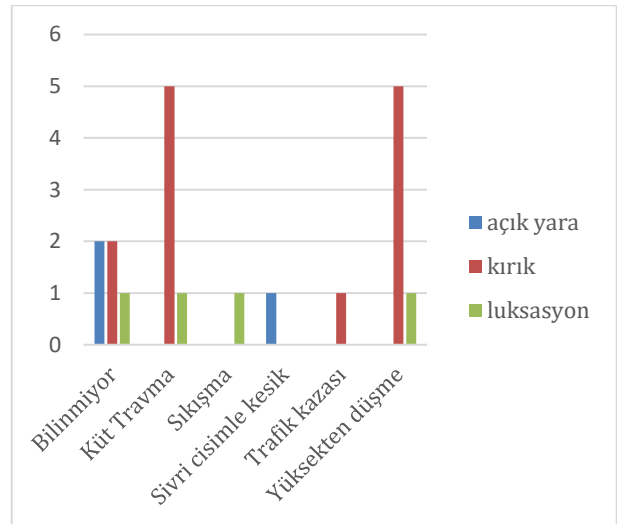
Değişik travmatik nedenlerle arka ekstremitelerde belirlenen lezyonların çoğunluğunu kırık oluşturmuştur. Buna göre; 13 olgu'da kırık (%65), 4 olgu'da luksasyon (%20) ve 3 olgu'da açık yara (%15) belirlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Olgularda oluşan lezyonların dağılımı.

Figure 12. Distribution of lesions in the cases.

Ayrıca travmatik nedene göre oluşan lezyonların dağılımı Şekil 13'de sunulmuş olup, buna göre yüksekten düşme ve küt travmalar çoğunlukla kırık ile sonuçlanırken, luksasyon oluşumunda bu travmatik nedenlere ek olarak sıkışmanın da etken olduğu belirlenmiştir.



Şekil 13. Olguların travmatik nedenine göre oluşan lezyonların dağılımı.

Figure 13. Distribution of lesions according to the traumatic cause of the cases.

#### Olguların Postoperatif Muayene Bulguları

Postoperatif dönemde periyodik olarak olguların 2 ay süresince klinik, radyolojik kontrolleri sürdürüldü. Radyolojik kontrollerde kırık bölgelerinde açılı ya da yanlış kaynama, taşkın kallus oluşumuna ilişkin bulgular gözlenmemiştir. Caput femoris luksasyonu belirlenen olgularda eksizyon artroplastisi ve kapalı redüksiyon uygulanan hastalarda herhangi bir olumsuzluk belirlenmeyip, kalça ekleminde fonksiyonel iyileşmenin sağlandığı gözlenmiştir. Olgu no 12'de intramedullar pin uygulamasıyla gerçekleştirilen osteosentezin postoperatif radyolojik muayenesinde uygulanan pinin ucu kemik korteksini geçerek derialtında olduğu belirlenmiştir. Olguların uygulanan destekli bandajın etkisiyle, ilgili ekstremiteleri kullanımındaki olumsuzluk durumunu, daha sonra tolare ettikleri gözlenmiştir. Üçüncü hafta sonunda bandaj uzaklaştırılmıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Arka ekstremite travmatik lezyonlarını oluşturan nedenler arasında trafik kazaları, bir yerde sıkışma, hayvanların birbirleri ile olan kavgaları, kesici cisim ve ateşli silah yaralanmaları ile belirlenemeyen çeşitli nedenler sayılabilir (Swaim 1985). Hernon ve ark. (2018), kedilerle ilgili yaptıkları retrospektif çalışmada 185 travma olgusunun nedenlerini değerlendirmişler ve 104 trafik kazası (%56.2), 49 bilinmeyen nedenler (%26.5), 18 yüksekten düşme (%9.7), 6 köpek saldırısı (%3.2), 2 ateşli silah yaralanması (%1.1), 2 küt travma (%1.1), 2 kuyruktan çekilme (%1.1), 1 at çifte darbesi (%0.5) ve 1 de çarpma sonucu oluşan yaralanma (%0.5) şeklinde rapor etmişlerdir. Bu olgulardan 116'sı çoklu travma yaralanmalarından etkilenirken 69'unun sadece bir travmatik etkiye maruz kaldığı belirtilmiştir. Literatür veride ilk sırada trafik kazası etken olarak belirtilmiş olup, çalışma olgularında ilk sırada yüksek düşme olmasıyla farklılık göstermiştir. Çalışmada sadece bir olguda trafik kazası etken olmuştur.

Ali (2013), tarafından 5 yıllık (2005-2010) bir dönemdeki kedi ve köpeklerde gerçekleştirilen bir retrospektif çalışmada 650 olgudan 116'sında (%17.8) kırık belirlenmiş, bunların %67'si köpek ve %23'ün kedi olduğu rapor edilmiştir. Kırıkla sonuçlanan travmaların çoğunluğunda köpeklerde trafik kazaları etken olurken, kedilerde yüksekten düşme etken olmuştur. Bu çalışmada değerlendirilen kedilerdeki 28 travmanın 10'u yüksekten düşme (%35.7), 6'sı trafik kazası (%21.4), 4'ü evde yaşanan bir travma (%14.2), 4'ü hayvan ısırığı (%14.2), 3'ü insan kaynaklı şiddet (%10.7) ve 1'i de bilinmeyen bir neden (%3.5) olarak aktarılmıştır. Çalışma olgularında belirlenen travmatik nedenlerin dağılımında; 6 olgu'da yüksekten düşme (%30), 6 olgu'da küt travma (%30), 1 olgu'da trafik kazası (%5), 1 olgu'da bir yerde sıkışma (%5), 1 olgu'da sivri cisim kesimi (%5) olurken 5 olgu'da (%25) lezyonu oluşturan neden belirtilmemiştir. Bu dağılımda yüksekten düşme nedeninin ilk sırada oluşu ve oransal dağılımı literatür veri ile benzer olup, ayrıca aynı oranda küt travmanın eşlik etmesi literatür veriden farklılık göstermiştir.

Yaşam alanları ev olan, ancak dışarıya çıkmalarına izin verilen genç erkek kedilerde travmalara daha çok rastlandığı bildirilmiştir (Buffington 2002; Rochlitz 2003). Ancak Ali (2013) ve Senn ve ark. (2004) çalışmalarında değerlendirilen travma geçmişi olan kedilerin çoğunluğunun dişi kediler olduğu belirtilmiştir. Çalışma olgularımızın cinsiyet dağılımı (%55 dişi kediler) da Ali (2013) ve Senn ve ark. (2004)'nın literatür verileri ile paralellik göstermektedir.

Ali (2013) ile Senn ve ark. (2004) çalışmalarında kliniğe getirilen olguların büyük çoğunluğunu genç hayvanların oluşturduğu ve yaş medyanını 30 aylık olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Çalışma olgularının yaş dağılımı da benzer olduğu belirlenmiştir.

Travmatik nedenlerle oluşan lezyonların kısa sürede sağaltımı önemlidir (Selcer ve ark. 1987). Çalışma olgularındaki travmatik lezyonların endike olan sağaltım girişimleri en uygun zaman içinde gerçekleştirilmiş ve postoperatif süreye ilişkin herhangi bir olumsuzlukla karşılaşmamıştır.

Kedilerde kırık şekillenmesinde ırk, cinsiyet ve yaş predispozisyonu bulunmamaktadır. Kırık oluşumundaki en çok rastlanan neden yüksekten düşmelerdir. Yaşam alanlarına göre trafik kazaları da etkindir (Fossum 2017). Çalışma olgularında kırık oluşturan başlıca nedenler de

benzer özellikte olarak, yüksekten düşme ilk sırada olup aynı oranda küt travma da etken olurken, trafik kazası ancak bir olgu için etken olmuştur.

Kırığın sağaltımındaki amaç, fragmentlerin pozisyonunu ve fiksasyonunu gerçekleştirdikten sonra en kısa sürede en ideal kaynama ile ekstremite fonksiyonunu tekrar kazandırmaktır. Ekstremitenin uzun kemiklerinin transversal, spiral, oblik ve bazı parçalı kırık sağaltımında İM pin ile internal fiksasyon sağlanabilir (Fossum 2012; Sağlam ve ark. 1999). Çalışma olgularında endike olan intramedüller pin uygulamaları en kısa zamanda gerçekleştirilirken, postoperatif taşkın kallus gelişimi, açılı ya da yanlış kaynama oluşumu bulgularına rastlanılmamıştır.

Kedilerin eksizyon artroplastisini çok iyi tolere ettiği belirtilmiştir (İki ve Sağlam 2004). Eksizyon artroplastisi maliyeti düşük, başarı oranı yüksek olan bir sağaltım seçeneğidir (İki ve Sağlam 2004; Piermattei ve ark. 2006). Çalışmada olgu no 1'de caput femoris kırığı ve olgu no 2'de caput femoris luksasyonu sağaltımında endike olan eksizyon artroplastisi uygulanarak, fonksiyonel iyileşme sağlanmıştır.

Trochanter major'un avülsiyon kırıklarında Steinmann pin, Kirschner teli ve germe teli ile uygulamalarıyla fiksasyon gerçekleştirilir (Piermattei ve ark. 2006). Olgu no 7'de şekillenmiş olan trochanter major avülsiyon kırığında Steinmann pini ve germe teli kombinasyonu ile fiksasyon sağlandı.

Distal femur kırıklarında tek ya da çoklu intramedüller pin uygulaması, Rush pinleri, Kirschner telleri ile çapraz çivileme yöntemleri interkondiler kırıklarda da vidayla fragmentleri birbirine tutturma yöntemi önerilmektedir (Piermattei ve ark. 2006; Simpson ve Lewis 2003). Bu çalışmada suprakondiler femur kırığı belirlenen olgu no 8'de çapraz rush pini ve çapraz Kirschner teli uygulamasıyla kırığın fiksasyonu sağlandı. Olgu no11'de çapraz rush pini ve lag vidası uygulamasıyla suprakondiler ve intrakondiler kırığın fiksasyonu sağlandı.

Basit diyafizer tibia kırıkları intramedüller pin, plak, eksternal fiksator, serklaj teli ve intramedüller pin uygulamalarıyla sağaltılabilir (Boudrieau 2003). İntramedüller pinle kombine edilerek çoklu serklaj uygulamaları, ekonomik yönden uygun olması yanında diyafizer spiral ve uzun oblik kırık sağaltımlarında başarılı sonuçlar alınmaktadır (Yardımcı ve Çetinkaya 2007; Montavon ve ark. 2009). Olgu no 12 ve 17'deki tibia'nın diyafizer kırıklarında intramedüller pin uygulamasıyla kırığın fiksasyonu sağlandı. Olgu no 10 diyafizer kırığında intramedüller pin ve serklaj teli uygulamasıyla kırığın fiksasyonu gerçekleştirildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada, kedilerde karşılaşılan arka ekstremite travma lezyonlarının genel olarak tanımı, nedenleri, lokalizasyonu ve klinik olgular için endike olan sağaltım yöntemleri ve sonuçları ile uygulanan bu sağaltım girişimlerine ait detaylı bilgiler verilmiştir. Açık redüksiyon ve fiksasyon gerektiren lezyonların sağaltımı ile kırık olgularında başarılı sonuçlar alınmıştır. Olguların kırıkların ağırlıklı olarak, femur ve tibia'da lokalize olduğu gözlemlendi. Luksasyon belirlenen olgu sayısı sınırlı olsa da, sağaltımlarındaki kapalı redüksiyon endikasyonu ile fonksiyonel iyileşme gerçekleştirildi. Çalışmanın klinik pratik uygulamalar için yönlendirici bir katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Kedilerde karşılaşılan arka ekstremitelere lezyonlarının oluşum nedeni çoğunlukla yüksekten düşme ve küt travma gibi şiddetli travmalardır. Kedilerde arka ekstremite lezyonlarına oldukça sık rastlanmaktadır. Bu olgularda klinik, nörolojik ve radyolojik muayenelerinin dikkatli ve

ayrıntılı bir şekilde yapılması gerekir. Travmatik bir etki direkt olarak etkilemiş olduğu yerde lezyon yaratırken, her olgunun olası diğer lezyonlar yönünden sistematik muayeneleri yapılırken, gerektiğinde ileri tanı yöntemleri de kullanılmalıdır. Kırıkların tipi, lokalizasyonu, deplasman durumu, hastanın mizacı göz önünde bulundurularak endike olduğuna karar verilen konservatif ya da operatif sağaltım yöntemi kısa zamanda gerçekleştirilmelidir. Deplasman bulunmayan kırıklarında destekli bandaj veya kısıtlı alan uygulamaları yeterli olabilir. Konservatif sağaltım uygulanan bu olgularda rutin bakım ve kontrol işlemleri sürdürülmelidir. Ancak endike olduğu durumlarda operatif sağaltım tercih edilebilir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MS, HMT, AF  
Tasarım: MS, HMT, AF  
Denetleme/Danışmanlık: MS, HMT, AF  
Veri Toplama ve/veya İşleme: MS, HMT, AF  
Analiz ve/veya Yorum: MS, HMT, AF  
Kaynak Taraması: MS, HMT, AF  
Makalenin Yazımı: MS, HMT, AF  
Eleştirel İnceleme: MS, HMT, AF

## KAYNAKLAR

- Ali LB (2013).** Incidence, occurrence, classification and outcome of small animal fractures: a retrospective study (2005-2010). *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7 (3), 191-196.
- Aslanbey D (2002).** Veteriner Ortopedi ve Travmatoloji, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Boudrieau RJ (2003).** Fractures of the radius and ulna. In: *Textbook of Small Animal Surgery*, Slatter D (Ed), 1953-1973, WB Saunders, Philadelphia.
- Buffington CT (2002).** External and internal influences on disease risk in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 220 (7), 994-1002.
- Fossum TW (2012).** *Small Animal Surgery*. Mosby Inc. St. Louis.
- Fossum TW (2017).** *Small Animal Surgery*. Mosby Inc. St. Louis.
- Harari J, Seguin B, Bechuck T (1996).** Closed repair of tibial and radial fractures with external skeletal fixation. *Compendium on Continuing Education*, 18, 651-64.
- Hernon T, Gurney M, Gibson S (2018).** A retrospective study of feline trauma patients admitted to a referral centre. *J Small Anim Prac*, 59 (4), 243-247.
- İki Y, Sağlam M (2004).** Köpeklerde caput ve collum femoris'in excision arthroplastisi. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 10 (1-2), 43-47.
- Johnson AL, Dunning D (2005).** *Atlas of Orthopedic Surgical Procedures of the Dog and Cat*. Elsevier Inc, St. Louis.
- Kenneth J, Joseph D (2004).** *Handbook of Fractures*. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- Kolata RJ, Kraut NH, Johnston DE (1974).** Patterns of trauma in urban dogs and cats: a study of 1000 cases. *J Am Vet Med Assoc*, 164(5), 499-502.
- Kolata RJ, Johnston DE (1975).** Motor vehicle accident in urban dogs: a study of 600 cases. *J Am Vet Med Assoc*, 167 (10), 928-941.
- Kolata RJ (1980).** Trauma in dogs and cats: an overview. *Vet Clin North Am Small Anim Prac*, 10 (3), 515-522.
- Montavon PM, Voss K, Langley-Hobbs SJ (2009).** *Feline Orthopedic Surgery and Musculoskeletal Disease*. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Piermattei DL, Flo GL (1997).** Fractures of the femur and patella. In: *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. Brinker WO, Piermattei DL, Flo GL (Ed), 469-515, WB Saunders, Philadelphia.
- Piermattei DL, Flo GL, Brinker WO (2006).** *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*, W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- Rochlitz I (2003).** Study of factors that may predispose domestic cats to road traffic accidents: part 1. *Veterinary Record*, 153 (18), 549-553.
- Sağlam M, Kaya Ü (2000).** Köpeklerde ön çapraz bağ kopmalarının sağaltımında modifiye intrakapsüler musculus tensor fasciae latae grefti uygulaması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47(1), 81-88.
- Sağlam M, Özba B, Kaya Ü, Bilgili H (1999).** Köpeklerde femurun distal Salter Harris tip I ve tip II kırıklarının çapraz pin tekniği ile osteosentezi üzerine klinik çalışmalar. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 5 (3-4), 66-71.
- Schebitz H, Kostlin R, Matis U, Brunnerberg L (1983).** Fractures of the jaw in dogs-fractures of the region of the pars incisiva mandibulae and the proc. Alveolaris ossis incisivi. *Kleintierpraxis*, 28, 285-290.
- Scott HW, Mc Laughlin RM (2007).** *Feline Orthopedics*. Manson, London.
- Selcer BA, Buttrick M, Barstad R, Riedesel D (1987).** The incidence of thoracic trauma in dogs with skeletal injury. *J Small Anim Prac*, 28(1), 21-27.
- Senn NA, Gadallah SM, Zabady MK (2004).** Studies on some bone disorders in cats: incidence, radiological assessment and surgical management. *J Egypt Vet Med Assoc*, 64(3), 113-137.
- Simpson DJ, Lewis DD (2003).** Fractures of the femur In: *Textbook of Small Animal Surgery*, Slatter D (Ed), 2059-2089, WB Saunders, Philadelphia.
- Slatter D (2003).** *Textbook of Small Animal Surgery*. Elsevier, Philadelphia.
- Swaim SF (1985).** Management and bandaging of soft tissue injuries of dog and cat feet. *J Am Anim Hosp Assoc*, 21 (3), 329-340.
- UsAK (2004).** Erişim Adresi, [www.medicine.ankara.edu.tr/surgical\\_medical/turkish/kadro/kurs.html](http://www.medicine.ankara.edu.tr/surgical_medical/turkish/kadro/kurs.html) Erişim Tarihi: 21/09/2004.
- Yardımcı C, Çetinkaya MA (2007).** Kedilerde diyafizer segmental ve parçalı femur kırıklarının intramedüller pin ve serklaj kombinasyonu ile sağaltımı: 17 olgu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54 (1), 11-16.



# VAN VETERINARY JOURNAL



## Article Copyright Transfer Agreement Form

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

**Title of the article:**

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

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

### Authorized Researcher

Title, Name-Surname : .....

Full Address : .....

e- mail : .....

Tel, Fax : .....

Date and Signature : .....



### Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is ***Van Vet J.***
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication. Article plagiarism report: Before submitting an article to our journal, the similarity of the article should be determined and uploaded to the system with appropriate plagiarism software programs (iThenticate, Turnitin etc.). The overall similarity rate is expected to be below 10%, but up to a 15% similarity rate is allowed by the Editorial Board, depending on the nature of the study. Articles that are over this determined rate are returned to the author..
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://dergipark.gov.tr/vanvetj> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures, graphs and references; original article should not exceed 15 pages, short paper and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 250 words. Abstract should include **Aim, Material and Methods, Results** and **Suggestion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system. In addition, if there is a requirement and necessity for "Ethics Committee Approval" in scientific studies sent to our journal, explanatory information including the name, number and date of the ethics committee from which the ethics committee approval /

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

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

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

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

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

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

**14- Original Article:**

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

**Case Reports:**

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

**Short Paper:**

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

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

## Articles:

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

**Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. (1985).** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England J Med*, 312 (7), 404-407. (For articles with more than 6 authors)

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

## Books:

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

## Books chapters:

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

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

## Anonymus

**(1)** [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/) Access date: 10 January 2009.

## Thesis:

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

## Paper Submitted at the Scientific Meeting:

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

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

**17-** Article publications in this Journal is FREE.

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

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

Correspondence: Prof. Dr. Cumali OZKAN (Editor)

Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary, Journal Editorial, 65080-Campus/Van/ TURKEY. e-mail: [vfd@yyu.edu.tr](mailto:vfd@yyu.edu.tr) Phone: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 432 225 11 27