

**ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES**

- The Substitution of Corn Silage with Potato Pulp Silage at Differing Level in Dairy Cows on Milk Yield, Composition and Rumen Volatile Fatty Acids..... 01**  
Süt İnekleri Rasyonlarına Mısır Silajı Yerine Farklı Düzeylerde Katılan Patates Posası Silajının Süt Verimi, Süt Bileşenleri ve Rumen Uçucu Yağ Asitleri  
H. H. ŞENYÜZ, M. A. KARSLI
- İyonize Radyasyonun Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi..... 11**  
The Ionizing Radiation Effect on Liver and Kidney Tissue  
M. BARAN, G. Ö. ÖNDER, Ö. GÖKTEPE, E. BALCIOĞLU, O. G. Yıldız, A. YAY
- Ocular Lesions and Neurologic Findings in Traumatic Birds: A Retrospective Evaluation of 114 Cases..... 19**  
Travmatik Kuşlarda Oküler Lezyonlar ve Nörolojik Bulguları: 114 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi  
A. DEMİR, K. GERBAGA OZSEMİR
- Türkiye’de Yetiştirilen Holştayn Melezi Sığırlarda BLAD ve FXID Hastalıklarının Araştırılması..... 26**  
Investigation of FXID and BLAD Diseases in Holstein Crossbreed Cattles Reared in Turkey  
E. G. AKSEL, F. DALDABAN, K. ARSLAN, H. H. KEÇELİ, B. AKYÜZ
- Veteriner Fitoterapi ve Etnoveteriner Hekimlikte de Kullanılan *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L. Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi..... 31**  
Determination of Chemical Contents of *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Laurus nobilis* L., Also Used in Veterinary Phytotherapy and Ethnoveterinary Medicine  
M. YİPEL, S. B. EMİROĞLU, M. TÜRKMEN, E. TÜRK, A. İLHAN, F. C. KIRGIZ, İ. O. TEKELİ
- The Effects of Pre-Superoovulation GnRH and Short-Term Progesterone Administrations on the Quantity and Quality of Bovine Embryos ..... 41**  
Süperovulasyon Öncesi GnRH ve Kısa Süreli Progesteron Uygulamalarının Sığır Embriyolarının Sayısı ve Kalitesi Üzerine Etkisi  
U. KARA, T. BEKYÜREK

**DERLEMELER / REVIEW ARTICLES**

- Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi..... 48**  
MicroRNA (miRNA) Expression Profiling by Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)  
Ö. SİDEKLİ, Ö. KORKMAZ AĞAOĞLU
- Acil Veteriner Hekimliğinde Ultrasonografik Muayene Yöntemleri..... 57**  
Ultrasonographic Examination Methods in Emergency Veterinary Medicine  
Ö. ŞENGÖZ ŞİRİN, M. FİDAN, A. BUMİN

**OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS**

- Neuronal Lipofuscinosis in a Hairy Goat..... 62**  
Bir Kıl Keçisinde Nöronal Lipofusinozis  
H. AVCI, S. S. BİRİNCİOĞLU, E. T. EPİKMEN, A. AYDOĞAN
- Nadir Bir Olgunun Sunumu: Bir Van Kedisinde Prolapsus Uteri..... 65**  
A Rare Case Report: Uterine Prolapse in a Van Cat  
Y. E. ATAY, Y. AKAR



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



ISSN-1304-7280

# Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,  
Erciyes University

**Yılda 3 sayı yayımlanır**  
Published 3 issues per year

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

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

**Yıl / Year : 2021**  
**Cilt / Volume : 18**  
**Sayı / Number : 1**

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

E-posta: [ercvet@gmail.com](mailto:ercvet@gmail.com)

**Baskı Tarihi:** Nisan 2021

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

**Sahibi / Owner**

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

**Editörler Kurulu / Editorial Board**

**Baş Editör / Editor-in Chief**

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

**Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board**

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Öğr. Üyesi Elif ÇELİK (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

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

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

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

**İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor**

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

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Yazışma Adresi / Correspondence**

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

**http://ercivet.erciyes.edu.tr**

**E-posta :** ercivet@gmail.com

**Tel :** 0 352 339 94 84

**Fax :** 0 352 337 27 40

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

**Mizanpaj / Designer:** Erhan GÜMÜŞ

**Basım / Print:** Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Sayfa / Page

### ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- The Substitution of Corn Silage with Potato Pulp Silage at Differing Level in Dairy Cows on Milk Yield, Composition and Rumen Volatile Fatty Acids**..... 01  
Süt İnekleri Rasyonlarına Mısır Silajı Yerine Farklı Düzeylerde Katılan Patates Posası Silajının Süt Verimi, Süt Bileşenleri ve Rumen Uçucu Yağ Asitleri  
H. H. ŞENYÜZ, M. A. KARSLI
- İyonize Radyasyonun Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi**..... 11  
The Ionizing Radiation Effect on Liver and Kidney Tissue  
M. BARAN, G. Ö. ÖNDER, Ö. GÖKTEPE, E. BALCIOĞLU, O. G. Yıldız, A. YAY
- Ocular Lesions and Neurologic Findings in Traumatic Birds: A Retrospective Evaluation of 114 Cases**..... 19  
Travmatik Kuşlarda Oküler Lezyonlar ve Nörolojik Bulguları: 114 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi  
A. DEMİR, K. GERBAGA OZSEMİR
- Türkiye'de Yetiştirilen Holştayn Melezi Sığırlarda BLAD ve FXID Hastalıklarının Araştırılması**..... 26  
Investigation of FXID and BLAD Diseases in Holstein Crossbreed Cattles Reared in Turkey  
E. G. AKSEL, F. DALDABAN, K. ARSLAN, H. H. KEÇELİ, B. AKYÜZ
- Veteriner Fitoterapi ve Etnoveteriner Hekimlikte de Kullanılan *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L. Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi**..... 31  
Determination of Chemical Contents of *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Laurus nobilis* L., Also Used in Veterinary Phytotherapy and Ethnoveterinary Medicine  
M. YİPEL, S. B. EMİROĞLU, M. TÜRKMEN, E. TÜRK, A. İLHAN, F. C. KIRGIZ, İ. O. TEKELİ
- The Effects of Pre-Superoovulation GnRH and Short-Term Progesterone Administrations on the Quantity and Quality of Bovine Embryos** ..... 41  
Süperovulasyon Öncesi GnRH ve Kısa Süreli Progesteron Uygulamalarının Sığır Embriolarının Sayısı ve Kalitesi Üzerine Etkisi  
U. KARA, T. BEKYÜREK

### DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi**..... 48  
MicroRNA (miRNA) Expression Profiling by Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)  
Ö. SİDEKLİ, Ö. KORKMAZ AĞAOĞLU
- Acil Veteriner Hekimliğinde Ultrasonografik Muayene Yöntemleri**..... 57  
Ultrasonographic Examination Methods in Emergency Veterinary Medicine  
Ö. ŞENGÖZ ŞİRİN, M. FİDAN, A. BUMİN

### OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- Neuronal Lipofuscinosis in a Hairy Goat**..... 62  
Bir Kıl Keçisinde Nöronal Lipofusinozis  
H. AVCI, S. S. BİRİNCİOĞLU, E. T. EPİKMEN, A. AYDOĞAN
- Nadir Bir Olgu Sunumu: Bir Van Kedisinde Prolapsus Uteri**..... 65  
A Rare Case Report: Uterine Prolapse in a Van Cat  
Y. E. ATAY, Y. AKAR



**The Substitution of Corn Silage with Potato Pulp Silage at Differing Level in Dairy Cows on Milk Yield, Composition and Rumen Volatile Fatty Acids\***

Hasan Hüseyin ŞENYÜZ<sup>1</sup> Mehmet Akif KARSLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>International Center for Livestock Research and Training, Mamak, Ankara-TURKEY

<sup>2</sup>Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale-TURKEY

**Corresponding author:** Hasan Hüseyin ŞENYÜZ; E-mail: hasansenyuzvet@yahoo.com; ORCID: 0000-0002-3695-1794

**How to cite:** Şenyüz HH, Karslı MA. The substitution of corn silage with potato pulp silage at differing level in dairy cows on milk yield, composition and rumen volatile fatty acids. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 18(1):1-10

**Summary:** The aim of this study was to determine the quality of potato pulp silage (PPS) prepared with wheat bran and barley straw and the effects of the substituting corn silage with potato pulp silage at differing levels in dairy cows on milk yield, composition and rumen volatile fatty acid (VFA). The study consisted of two experiments. Nutrient contents, fermentation parameters, *in situ* organic matter (OM) and starch degradabilities, *in vitro* digestibility (IVD) and metabolic energy (ME) content of PPS were determined in the first experiment. The effects of substituting corn silage with potato pulp silage at 0%, 15%, 30% and 45% in the diet of lactating 12 dairy cows on feed intake, milk yield, milk components, rumen fermentation parameters were evaluated in the second experiment. While dry matter (DM), OM and crude protein (CP) contents, pH of silages were statistically similar, starch content, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), ME, net energy lactation (NE<sub>L</sub>), and lactic acid values were significantly higher in PPS compared with corn silage (P<0.05). Organic matter intake, milk yield, the composition of milk, post-feeding pH and total VFA levels of ruminal fluid at all sampling hours were similar among the dairy cows (P>0.05). It was concluded that; PPS prepared with wheat bran and straw had a very good silage quality and were even better than corn silage (control). Substitution of corn silage with PPS up to 45% did not cause any negative effects on rumen fermentation parameters and can be safely substituted with corn silage up to 45% in dairy cow diets.

**Key words:** Corn silage, dairy cattle, *in situ*, milk composition, potato pulp

**Süt İnekleri Rasyonlarına Mısır Silajı Yerine Farklı Düzeylerde Katılan Patates Posası Silajının Süt Verimi, Süt Bileşenleri ve Rumen Uçucu Yağ Asitleri**

**Özet:** Bu çalışmanın amacı buğday kepeği ve saman ilave edilerek hazırlanan patates posası silajının (PPS) kalite özellikleri ile süt sığırlarında mısır silajı yerine değişik oranlarda patates posası silajı kullanımının süt verimi, sütün bileşimi ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) üzerine olan etkilerini saptamaktır. Bu çalışma iki aşamada yürütülmüştür. İlk aşamada PPS'nin besin madde içerikleri, fermentasyon parametreleri, *in situ* organik madde (OM) ve nişasta sindirilebilirlikleri, *in vitro* organik madde sindirilebilirlik (OMS) ile enerji düzeyleri saptanmıştır. İkinci aşamada ise PPS, mısır silajı yerine %0, 15, 30 ve 45 oranlarda ikame edilmiş ve 12 baş süt ineğinde yem tüketimi, süt verimi, süt bileşimi ile rumen fermentasyon parametreleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Silajların kuru madde (KM), organik madde (OM), hamprotein (HP) ve pH içerikleri istatistik olarak benzer, nişasta, *in vitro* OM sindirilebilirlikleri, metabolik enerji (ME), net enerji laktasyon (NE<sub>L</sub>), ile laktik asit düzeyleri PPS'de mısır silajına göre daha yüksek bulunmuştur (P<0.05). İneklerin OM tüketimi, süt verimi, süt bileşenleri, yemleme sonrası rumen pH ve UYA arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur (P>0.05). Sonuç olarak buğday kepeği ve saman ile hazırlanan PPS'nin silaj kalitesinin çok iyi ve hatta mısır silajından daha iyi olduğu belirlenmiştir. Süt ineği rasyonlarına mısır silajı yerine %45 oranında PPS katılması ineklerin rumen fermentasyon parametrelerinde olumsuz etkiye neden olmayacağı ve %45 oranında güvenle kullanılabileceği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** *In situ*, mısır silajı, patates posası, süt bileşimi, süt sığırı

**Introduction**

The highest cost among the livestock expenses is feed expense in Turkey (Boğa and Çevik, 2012). One

of the most serious problems for Turkish dairy farmers is lack of high-quality forage production. Actually, even getting enough amounts of roughages, not high-quality forages can sometimes be a problem. Especially, this problem has become very important in drought years and Turkish farmers had to import roughage. In order to solve the roughage problem; one has to extend to forage planting area and/or to create alternative roughage sources such as by-products.

Geliş Tarihi/Submission Date : 30.06.2020  
Kabul Tarihi/Accepted Date : 16.10.2020

\*This study was presented in the Mediterranean Veterinary Congress coupled with 7th REEV-MED General Assembly, 13-14 December 2018, Kırıkkale University.

In 2017, a total of 388190674 tons of potato has been produced in the world. China is the number one among the most potato producing countries with 98988621 tons of potato per year. Indian is the second with 48523834 tons, Russia is the third with 29502491, Ukraine is the fourth with 22126868 tons and the USA is the fifth 20185915 tons in the world. Turkey is the 19<sup>th</sup> at potato production in the world. In 2017, a total of 4658288 tons of potato has been produced in Turkey (FAO, 2020).

While almost half of the produced potato is consumed as fresh vegetable, the rest of potato is used as processed food product, animal feed, industrial starch production or seed in the world (Bakshi et al., 2016). A significant part of the potato processed in starch industry is considered as waste. Indeed, one million tons of potato is been processed in starch industry in Japan every year and 10% of processed potato is utilized as waste (Oda et al., 2002). Thus, if this 'waste' product can be utilized as feed, it may have great feed potential for ruminant animals.

Potato starch industry residue (especially potato pulp) that is not well-known in Turkey has been utilized as animal feed in countries where potato production is in excess (Pen et al., 2005). Indeed, Wang et al. (2010) have used the solid fermented potato pulp as poultry feed. On the other hand, Aibibula et al. (2007) substituted the PPS with rolled corn in the diets of ruminant animals. These studies have shown that this product provides important benefits to the economy of countries when it is properly utilized.

The main limitations in using vegetable waste such as potato pulp as livestock feed are the high moisture content and presence of contaminants. Drying and ensiling can be a good option to enhance storage life and use of these products as animal feeds easier (Bakshi et al., 2016). Silage is probably the most eco-

nomical way to conserve it. Addition of moisture absorbents into potato pulp silage reduce the spoiling and also improve the silage quality (Mohamadian et al., 2016).

Thus, the objective of this study was to evaluate the quality of PPS prepared with wheat bran and barley straw and the effects of the substituting corn silage with PPS at differing levels in dairy cows on milk yield, composition and rumen volatile fatty acids.

### Material and Methods

This study approved by International Center for Livestock Research and Training Animal Research Ethics Committee (30.11.2015/117). In order to obtain potato silage with an approximately 30% DM, 6% (300 kg) wheat bran and 7% (350 kg) barley straw were added into 5 tons potato pulp and ensiled after complete mixing. Corn silage was also prepared at the same time. Approximately, after 60 days of the ensiling period, then, feeding trial was carried out.

A corn silage based diet was prepared (Control group), then, 3 experimental diets were created by substituting corn silage with 15%, 30% and 45% PPS (Table 1). A total of 12 dairy lactating cows, 4 Holstein, 4 Brown Swiss, 4 Simmental cows at their peak of lactation with similar milk yield obtained from IC-LRT were allocated into one of four groups. Breeds and milk yields of cows were used as a block.

An experiment was carried out as cross-over design with two periods to increase the number of replications. Allocation of animals into groups was performed with completely randomized block design. Each feed was consumed by 6 animals with this design. Potato pulp used in this experiment was obtained from Konya Seker Company Konya Seker Potato Starch product plant. Barley straw and wheat bran were bought from the market. Corn silage, alfalfa, grass hay, consantrate mixture were provided by International

**Table 1.** Mean of daily feed consumption on wet basis

	Control	15% PPS	30% PPS	45% PPS		
<b>Corn Silage kg/d</b>	18.0	15.3	12.6	9.9		
<b>Potato Pulp Silage kg/d</b>	-	2.7	5.4	8.1		
<b>Grass Hay kg/d</b>	2.2	2.2	2.2	2.2		
<b>Alfalfa Hay kg/d</b>	2.2	2.2	2.2	2.2		
<b>Consantrate kg/d</b>	11.0	11.0	11.0	11.0		
<b>Consantrate</b>	<b>DM%</b> 90.00	<b>OM%</b> 92.89	<b>CP%</b> 16.85	<b>NDF%</b> 27.60	<b>ADF%</b> 9.73	
<b>Consantrate %</b>	<b>B</b> 52.4	<b>WB</b> 10.0	<b>C SFM</b> 11.010.0	<b>SBM</b> 13.0	<b>DCP</b> 1.0	<b>VM</b> 2.6

B: barley, WB: wheat bran, C: corn, SFM: sun flower meal, DCP: di calcium phosphate, VM: vitamin-mineral.

Center for Livestock Research and Training (ICLRT) Department of Cattle Breeding. Nutrient components of these feedstuffs are given in Table 1.

All of the cows were treated with Dectomax® and Anaverm® to eliminate internal and external parasites just before initiation of the experiment. Animals were individually fed and had free access to clean water, vitamin and mineral block. Each period of experiment consisted of 21 days, 13 days of adaptation to diets and 8 days of sample collection periods.

Daily feed intakes of animals were determined at the first five days of the sampling period. After complete cleaning of feed bunkers, all animals were individually fed twice a day (08:00 am and 06:00 pm). Then, at the end of fifth day, remainingorts were collected, weighted and subsampled for analysis. At the end of each adaptation period, all the cows were milked twice a day (at 02:30 and 14:30) with mobile milking machine, the amount of milk produced per cow/milking were measured and recorded to determine milk production throughout the sampling period. To determine the composition of milk, 1% of milk produced per day was composed at the last 4 days of the sampling period and then, 50 mL of milk was subsampled from the composted milk after through homogenization. Milk sample were kept at +4 C° and analyzed for fat, crude protein, lactose and dry matter using TEKA FOSS (Combi Foss™ FT+) at the end of each period. On the last day of sampling, rumen fluid was sampled at 0., 2., 4., 6. and 8. hours post-feeding from each animal and pH rumen fluid was immediately determined with a portable pH meter. After the pH determination, approximately 20 mL rumen fluid sample was added into sample tubes containing 2 mL 1/1 HCl (Absolute) and stored -18 °C for volatile fatty acid analysis.

To determine ruminal DM, OM, and starch degradability, 3 ruminally cannulated Holstein cattles were used. Approximately 3-4 g of dried silage samples with 2 mm particle size was introduced into Dacron bag with 45 µ pore size. Duplicate of each silage sample were placed into the ventral part of rumen of each animal for 0., 2., 4., 8., 12., 24. and 48. hours of incubation (Tuncer et al., 1989). After the removal of bags from rumen, bags were washed under running tap water until rinse water was clear, and then they were dried. DM, OM and starch content of residues were determined. Then, DM, OM, and starch degradability values of feeds were calculated with following equation:  $a + b \frac{(1 - e^{-ct})}{c}$ .

All the feedstuffs and part samples were analyzed to determine dry matter (DM), ash, crude protein (CP) according to AOAC (1990), NDF (Van Soest and Robertson, 1979), ADF (Goering and Van Soest, 1970) and starch (ISO, 2002) using the automatic polarimeter (WZZ-2B, China). While the pH of silage and rumen fluid were detected by a portable pH me-

ter (Bingöl et al., 2008), organic acid contents of silage and rumen fluid were also determined using HPLC described by Tjardes et al. (2000). Silage and ruminal ammonia-N contents were determined by distillation method described by Filya (2003). *In vitro* OM digestibility of silage samples was also determined based on Tilley and Terry (1963) modified by Marten and Barnes (1979) using the Daisy" incubator (ANKOM®, USA).

Milk samples were analyzed at Ankara Cattle Breed Association milk analysis laboratory using TEKA FOSS analysis machine.

Data on *in situ* degradation were analyzed as a completely randomized design using variance analysis of SAS (1995).

Animal performance trial was analyzed as Cross-over design. In this trial, 12 cows were randomly allotted in 4 groups within 2 periods using breed and milk yield as a block. Data were then analyzed according to the model shown below. In this model, factors A, B, C and D were group, cows, period and order, respectively. The fixed factors were A, C and D and the random factor was B. Then, the model was:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_j + B_{i(l)} + C_k + D_l + E_{ijkl}$$

Where:

$Y_{ijkl}$  = observation on cow i in trial j, period k and order l.

$$(i=1,2,3,4; j=1,2,3,4; k=1,2 \text{ ve } l=1,2)$$

$\mu$  = the overall mean.

$A_j$  = the fixed effect of trial j.

$B_{i(l)}$  = the random effect of subject (cow i) nested in order l.

$C_k$  = the fixed effect of period k.

$D_l$  = the fixed effect of order l.

$E_{ijkl}$  = random error.

Mixed procedure of (proc mixed) of SAS v8.2 was used for statistical analysis. Tukey test was used to separate the means. The statistical significance was considered at  $P < 0.05$  level.

## Results

Nutrient contents, *in vitro* digestibility and energy values of silages are given at Table 2. While DM, OM and CP contents of silages were statistically similar, starch content, *in vitro* OM digestibility, ME and  $NE_L$  values were significantly higher in PPS compared with corn silage ( $P < 0.05$ ). However, both NDF and ADF contents of corn silage were significantly higher than those of PPS ( $P < 0.05$ ).



**Table 2.** Means of ( $\pm$  SE) nutrient composition, fermentation parameters, in vitro digestibility and energy values of silages

Items	Corn Silage	Potato Pulp Silage	P
<b>DM</b>	28.65 $\pm$ 0.66	29.26 $\pm$ 0.07	0.89
<b>CA,%DM</b>	5.85 $\pm$ 0.30	5.45 $\pm$ 0.22	0.78
<b>OM,%DM</b>	94.15 $\pm$ 0.30	94.55 $\pm$ 0.22	0.78
<b>CP,%DM</b>	8.54 $\pm$ 0.19	7.97 $\pm$ 0.11	0.62
<b>Starch,%DM</b>	16.52 $\pm$ 1.49	39.45 $\pm$ 0.73	0.01
<b>NDF,%DM</b>	54.61 $\pm$ 0.88	32.07 $\pm$ 4.13	0.01
<b>ADF,%DM</b>	28.72 $\pm$ 0.88	17.15 $\pm$ 2.15	0.01
<b>Fermentation Parmeters</b>			
<b>pH</b>	4.09 $\pm$ 0.01	4.08 $\pm$ 0.01	0.98
<b>LA</b>	5.43 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	6.012 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.04
<b>AA</b>	2.62 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.012	0.01
<b>PA</b>	0.65 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.01
<b>BA</b>	-	-	1.0
<b>Ammonia-N</b>	0.54 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.06	-
<b>Digestibility and Energy Values</b>			
<b>IVOMD,%OM</b>	58.13 $\pm$ 0.59	77.29 $\pm$ 0.148	0.01
<b>ME, Mcal/kg</b>	2.56 $\pm$ 0.026	3.41 $\pm$ 0.01	0.01
<b>NE<sub>L</sub>, Mcal/kg</b>	1.30 $\pm$ 0.02	1.77 $\pm$ 0.01	0.01

DM: Dry Matter, CA: Crude Ash, OM: Organic Matter, CP: Crude Protein, ADF: Acid Detergent Fiber, NDF: Neutral Detergent Fiber, IVOMD: In vitro Organic Matter Digestibility, ME: Metabolisable Energy, NE<sub>L</sub>: Net Energy for Lactation, LA: Lactic Acid, AA: Acetic Acid, PA: Propionic Acid, BA: Butyric Acid, AMN: Ammonia Nitrogen.

Silage fermentation parameters are shown at Table 2. Silage pH and ammonia-N levels were similar between two silages ( $P>0.05$ ). Whereas lactic acid content was higher acetic acid, the propionic acid level was less in PPS compared with corn silage ( $P<0.05$ ).

In situ OM and starch degradabilities and fractions of silages are presented at Table 3 and 4, respectively. Potato pulp silage had significantly higher both OM and starch degradabilities after 48 h incubation than corn silage ( $P<0.05$ ). Corn silage had significantly higher water soluble degraded organic matter (WSOM),

water soluble starch (WSS), non-degradable starch (NDS) and non-degradable organic matter (NDOM) contents than potato pulp silage, but potential degradable organic matter (PDOM) and potential degradable starch (PDS) contents were significantly greater in potato pulp silage compared with corn silage ( $P<0.05$ ).

Daily DM, OM, and CP intakes were statistically similar ( $P>0.05$ ), but numerically decreased as the percentages of PPS increased in the diets (Table 5). Cows fed 45% PPS in their diet consumed 1.58 kg less daily DM compared to cows fed a control diet.

**Table 3.** Means of organic matter and starch degradable of silages

Groups	0. hours	2. hours	4. hours	8. hours	12. hours	24. hours	48. hours
Organic Matter Degradability, %OM							
<b>Corn Silage</b>	34.09 $\pm$ 1.01	30.99 $\pm$ 1.41	28.91 $\pm$ 1.05	36.02 $\pm$ 1.31	43.04 $\pm$ 1.02	56.10 $\pm$ 1.85	68.87 $\pm$ 1.40
<b>Potato Pulp Silage</b>	32.55 $\pm$ 1.00	32.97 $\pm$ 1.4	32.16 $\pm$ 0.93	47.37 $\pm$ 1.04	56.37 $\pm$ 4.07	71.75 $\pm$ 2.19	82.32 $\pm$ 0.83
<b>P</b>	0.31	0.47	0.07	0.01	0.01	0.01	0.01
Starch Degradability, %Starch							
<b>Corn Silage</b>	59.50 $\pm$ 0.66	51.87 $\pm$ 1.00	64.32 $\pm$ 0.53	66.07 $\pm$ 0.70	82.41 $\pm$ 0.31	90.80 $\pm$ 0.40	90.87 $\pm$ 0.44
<b>Potato Pulp Silage</b>	35.42 $\pm$ 0.95	33.67 $\pm$ 1.43	38.24 $\pm$ 0.85	58.83 $\pm$ 0.84	70.12 $\pm$ 2.76	92.85 $\pm$ 0.56	96.87 $\pm$ 0.15
<b>P</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01

**Table 4.** Means of organic matter and starch fractions of silages

Groups	Water Soluable	Potential Degradable	None Degradable
		Organic Matter, %OM	
Corn Silage	34.09±1.076	34.78±1.213	31.13±1.402
Potato Pulp Silage	32.55±1.001	49.77±0.913	17.68±0.829
<b>P</b>	0.53	0.02	0.01
Starch % Starch			
Corn Silage	59.50±0.66	30.84±0.76	9.65±0.44
Potato Pulp Silage	35.42±0.95	61.26±0.95	3.31±0.15
<b>P</b>	0.01	0.01	0.01

**Table 5.** Means of daily nutrient consumption of different level PPS consumed cattles, kg/day

	DM(kg)	OM	CP	NDF	ADF	DMBW (%)
<b>Control</b>	20.02±1.38	18.6±1.28	2.74±0.17	7.64±0.59 <sup>a</sup>	3.94±0.33 <sup>a</sup>	3.03±0.25
<b>15% PPS</b>	21.28±0.59	19.77±0.54	2.87±0.08	8.01±0.22 <sup>a</sup>	4.17±0.11 <sup>a</sup>	3.19±0.21
<b>30% PPS</b>	20.66±0.62	19.19±0.57	2.79±0.09	7.54±0.22 <sup>a</sup>	3.91±0.11 <sup>a</sup>	3.08±0.18
<b>45% PPS</b>	18.44±1.38	17.14±1.29	2.51±0.17	6.54±0.51 <sup>b</sup>	3.38±0.28 <sup>b</sup>	2.72±0.20
<b>SEM</b>	1.0527	0.9791	0.1306	0.4161	0.2254	0.2173
<b>P</b>	0.26	0.26	0.23	0.07	0.08	0.48

Control: 0% PPS, Group 1: 15% PPS, Group 2: 30% PPS, Group 3: 45% PPS (PPS: Potato Pulp Silage, DM: Dry Matter, OM: Organic Matter, CP: Crude Protein, NDF: Neutral Detergent Fiber, ADF: Asit Detergent Fiber, DMBW: Dry Matter Body Weight rate).

<sup>a, b</sup>: The different letter in same column indicates that statistically difference ( $p < 0.05$ ).

Similarly, daily NDF ( $P=0.07$ ) and ADF ( $P=0.08$ ) intakes tended to decrease as the percentages of PPS increased in the diets.

Daily milk yields and milk compositions are shown at Table 6. Daily milk yield did not change with the addition of PPS into a control diet ( $P > 0.05$ ). Daily milk yield was around 22 L for all the groups. The composition of milk was also similar among treatment groups

( $P > 0.05$ ). While the percentages of milk fat were 3.99, 4.38, 4.33, and 3.73%, the percentages of milk DM were 13.11, 13.50, 13.52, and 12.89% for corn silage, 15, 30, and 45% PPS groups, respectively.

Post-feeding pH's of ruminal fluids were similar at all sampling hours ( $P > 0.05$ ) (Table 7), except 6<sup>th</sup> h post-feeding. pH values did not drop below 6 in any group and at any sampling hours. Ruminal ammonia-N con-

**Table 6.** Means of milk yield, L and milk components, DM% of different level potato pulp silage consumed cattle

	Groups				SEM	p
	Control	15% PPS	30% PPS	45% PPS		
<b>Daily Milk Yield</b>	21.95±2.04	22.05±1.6	21.95±1.61	21.92±1.88	1.8075	0.99
<b>Milk Fat</b>	3.99±0.193	4.38±0.339	4.33±0.356	3.73±0.206	0.2891	0.38
<b>Protein</b>	3.32±0.229	3.40±0.149	3.46±0.134	3.32±0.200	0.1867	0.94
<b>Lactose</b>	5.26±0.196	5.34±0.189	5.32±0.153	5.34±0.315	0.1647	0.98
<b>Dry Matter</b>	13.11±0.407	13.50±0.500	13.52±0.500	12.89±0.51	0.4743	0.74
<b>Urea</b>	25.22±3.91	23.17±2.20	23.9±1.60	24.28±1.97	2.1807	0.95
<b>Non fat Dry Matter</b>	9.02±0.287	9.03±0.196	9.09±0.188	9.05±0.300	0.2519	0.99

PPS: Potato Pulp Silage.

**Table 7.** Means of ( $\pm$  SE) volatile fatty acid, pH and ammonia nitrogen values of received different hours ruminal fluid of different level potato pulp silage consumed cattles, mg/dL

	VFA	Control	15% PPS	30% PPS	45% PPS	SEM	P
<b>0. Hours</b>	Total	52.08 $\pm$ 10.17	53.8 $\pm$ 5.79	55.13 $\pm$ 7.82	51.52 $\pm$ 9.03	8.0665	0.17
	AA	64.99 $\pm$ 3.81	64.12 $\pm$ 4.02	52.74 $\pm$ 4.41	59.26 $\pm$ 1.94	3.7352	0.11
	PA	20.15 $\pm$ 2.87	21.91 $\pm$ 4.20	32.01 $\pm$ 4.12	23.33 $\pm$ 2.89	3.6179	0.10
	BA	14.71 $\pm$ 1.24	13.62 $\pm$ 2.07	13.88 $\pm$ 1.27	17.00 $\pm$ 1.81	1.6765	0.49
	pH	7.40 $\pm$ 0.285	7.68 $\pm$ 0.236	7.45 $\pm$ 0.345	7.40 $\pm$ 0.179	0.2634	0.85
	Ammonia-N	19.78 $\pm$ 2.56	22.31 $\pm$ 2.11	21.20 $\pm$ 3.05	20.70 $\pm$ 1.55	2.1596	0.46
<b>2. Hours</b>	Total	64.65 $\pm$ 7.74 <sup>a</sup>	72.8 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	56.67 $\pm$ 4.48 <sup>b</sup>	63.42 $\pm$ 2.73 <sup>a</sup>	4.8163	0.04
	AA	63.35 $\pm$ 3.36	58.8 $\pm$ 3.47	59.41 $\pm$ 3.77	62.07 $\pm$ 1.19	2.9823	0.67
	PA	22.29 $\pm$ 3.09	22.08 $\pm$ 1.43	23.19 $\pm$ 3.17	21.88 $\pm$ 2.4	2.6056	0.99
	BA	12.68 $\pm$ 0.72	14.59 $\pm$ 0.77	13.27 $\pm$ 1.94	15.40 $\pm$ 1.64	1.3827	0.51
	pH	6.88 $\pm$ 0.250	6.60 $\pm$ 0.124	7.06 $\pm$ 0.190	6.88 $\pm$ 0.050	0.1713	0.13
	Ammonia-N	22.71 $\pm$ 2.94	28.14 $\pm$ 1.90	21.75 $\pm$ 2.13	23.78 $\pm$ 2.84	1.7588	0.10
<b>4. Hours</b>	Total	65.2 $\pm$ 5.55	70.68 $\pm$ 19.18	70.34 $\pm$ 18.20	64.38 $\pm$ 5.87	14.1809	0.98
	AA	62.75 $\pm$ 2.90	58.46 $\pm$ 8.19	59.09 $\pm$ 8.76	61.45 $\pm$ 2.26	6.4292	0.95
	PA	22.71 $\pm$ 3.93	19.64 $\pm$ 5.67	18.64 $\pm$ 5.14	21.51 $\pm$ 3.97	4.8165	0.99
	BA	14.14 $\pm$ 1.81	20.72 $\pm$ 9.18	20.3 $\pm$ 8.50	13.70 $\pm$ 2.10	6.5774	0.81
	pH	6.77 $\pm$ 0.156	7.12 $\pm$ 0.365	7.00 $\pm$ 0.463	6.60 $\pm$ 0.153	0.3213	0.68
	Ammonia-N	24.24 $\pm$ 2.71	27.21 $\pm$ 2.80	28.42 $\pm$ 3.06	24.08 $\pm$ 2.90	2.8889	0.19
<b>6. Hours</b>	Total	59.23 $\pm$ 4.62	74.3 $\pm$ 7.58	74.76 $\pm$ 8.35	59.96 $\pm$ 4.82	6.7411	0.11
	AA	60.98 $\pm$ 2.58	60.6 $\pm$ 3.40	60.51 $\pm$ 3.59	61.52 $\pm$ 2.18	3.0642	0.99
	PA	24.31 $\pm$ 3.14	24.96 $\pm$ 3.39	24.69 $\pm$ 3.80	23.48 $\pm$ 3.43	3.5342	0.99
	BA	14.17 $\pm$ 1.87	11.48 $\pm$ 2.49	10.70 $\pm$ 2.11	13.99 $\pm$ 1.86	2.1452	0.45
	pH	6.30 $\pm$ 0.113 <sup>b</sup>	6.47 $\pm$ 0.080 <sup>b</sup>	6.27 $\pm$ 0.080 <sup>b</sup>	7.02 $\pm$ 0.182 <sup>a</sup>	0.1155	0.01
	Ammonia-N	17.79 $\pm$ 1.92	16.74 $\pm$ 1.04	16.45 $\pm$ 1.12	16.31 $\pm$ 1.61	1.4922	0.89
<b>8. Hours</b>	Total	51.33 $\pm$ 9.46	52.75 $\pm$ 5.45	74.57 $\pm$ 8.4	50.56 $\pm$ 8.71	7.9408	0.15
	AA	61.86 $\pm$ 3.28	63.24 $\pm$ 4.30	52.78 $\pm$ 4.02	58.16 $\pm$ 2.1	3.5918	0.14
	PA	20.16 $\pm$ 2.61 <sup>b</sup>	21.64 $\pm$ 3.18 <sup>b</sup>	31.63 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup>	23.89 $\pm$ 3.43 <sup>b</sup>	3.1678	0.06
	BA	15.58 $\pm$ 0.55	14.47 $\pm$ 1.87	13.28 $\pm$ 1.47	17.54 $\pm$ 2.06	1.5846	0.32
	pH	7.10 $\pm$ 0.268	7.43 $\pm$ 0.191	7.28 $\pm$ 0.336	7.08 $\pm$ 0.192	0.2525	0.73
	Ammonia-N	18.65 $\pm$ 1.93	20.90 $\pm$ 1.68	20.85 $\pm$ 2.24	20.15 $\pm$ 1.55	1.8063	0.13

PPS: Potato Pulp Silage.

VFA: Volatile Fatty Acid, AA: Acetic Acid, PA: Propionic Acid, BA: Butyric Acid,

<sup>a, b</sup>: The different letter in same row indicates that statistically difference ( $p < 0.05$ )

centrations were also similar among groups at all sampling hours ( $P > 0.05$ ). Typically, ruminal ammonia-N concentrations increased 2 to 4 h post-feeding and then, dropped slowly later on (Table 7).

Post-feeding ruminal total volatile fatty acid concentrations and the percentages of volatile fatty acids in total concentrations are presented at Table 7. Total volatile fatty acid concentrations varied from 50.56 to 74.76 mg/dL. The percentages of acetic acid, propionic acid and butyric acid ranged from 52.74, 18.64, and 10.70 to 64.99, 32.01, and 20.72%, respectively, for all groups and sampling times. Amounts of total fatty acids were generally similar among groups at all sampling hours ( $P > 0.05$ ), except 2 h post feeding. Percentages of volatile acids were also similar in general ( $P > 0.05$ ), except the percentage of propionic acid 8 h post-feeding.

## Discussion and Conclusion

The main objective of this study was to compare the silage quality of PPS with corn silage and effects of substituting it at differing levels with corn silage in dairy animal performance.

Since the DM content of potato pulp was tried to be made equal to that of corn silage, DM contents of silages were similar. Dry matter contents were at the lower edge of DM necessary for ideal silage making (Yaylak and Alçiçek, 2004). Dry matter content of PPS silage was lower than that of Pen et al. (2005) but similar to Sugimoto et al. (2008) and Zhang et al. (2012). It seemed that DM content of PPS was closely correlated to the level of other feedstuffs added into silage as moisture absorbent. Organic matter content of silages was similar. Organic matter content of PPS

was also similar with Sugimoto et al. (2008), Sugimoto et al. (2009) and Sugimoto et al. (2010) but lower than that of Zunong et al. (2009). It was thought that these differences may have resulted from contamination with soil and ash content of other feedstuffs used in silage making. Crude protein contents did not differ between silages. CP content of PPS was close to that of Zhang et al. (2012) but higher than those of Sugimoto et al. (2007) (potato pulp silage without any material), Okine et al. (2005) and Zunong et al. (2009). The CP content of PPS depends on mainly CP content of other material added into silage. In the current study, wheat bran increased CP content of PPS. While starch content was significantly higher, both NDF and ADF contents were significantly less in PPS silage compared with corn silage ( $P < 0.05$ ). Both NDF and ADF values observed for PPS in the current study were lower than that of Zhang et al. (2012). Nutrient contents of potato pulp silages mainly depend on two things; one is starch levels of potato pulp and the second is the nutrient content of other material added into silage. The differences in the nutrient contents of PPS in the literature might have been resulted from these two factors. In the current study, it seemed that the starch level of potato pulp was high as it can be understood from the starch level of PPS so that PPS in the current study had very desirable nutrient content as a silage.

*In vitro* OM digestion and energy values were significantly lower in corn silage than PPS ( $P < 0.05$ ). Whereas *in vitro* OMD was 58.13% in corn silage, it was 77.29% in PPS (Table 2). Since energy values were calculated from *in vitro* OM digestibilities, they showed a similar pattern with *in vitro* digestibility. In this study, the OMD value of PPS was similar with that of Zunong et al. (2009), but higher than that of Nicholson and Friend (1965). Mohamadian et al. (2016) has reported that the OMD value of PPS without any moisture absorbents was 75.84%, the OMD values of PPS prepared with different moisture absorbents ranged from 73.08% to 54.48%. The differences in OMD of PPS are more likely due to the starch content of potato pulp and the nature of feed stuffs used as moisture absorbent in PPS. A very high ME (13,24 MJ/kg DM) and NEL (8,56 MJ/kg DM) values has been reported for potato pulp (Kara et al., 2018), which supports the energy values obtained for PPS in the current study.

Silage pH values were similar between the two silages ( $P > 0.05$ ). These pH values were fairly close to pH values reported for PPS by Sugimoto et al. (2007; pH: 3.5 - 4), Sugimoto et al. (2008; pH: 4) and Zhang et al. (2012; pH: 3.9 - 4). The pH values observed in the current study were 4.08 and 4.09 for potato pulp and corn silages, respectively, which were in the range of ideal pH values of 3.8 - 4.2 for good silage fermentation (Ergün et al., 2002).

Among silage fermentation parameters, the concentration of lactic acid was higher but the concentrations of acetic and propionic acids were lower in PPS compared with corn silage ( $P < 0.05$ ). There was no butyric acid in both silages. It seemed that while PPS had more homo fermentative fermentation with high lactic acid and very low acetic acid production, corn silage had hetero-fermentative fermentation (Muck, 2002). The lack of butyric acid in both silages indicated a good silage fermentation as well. The silage ammonia nitrogen, an indication of soluble CP content, was similar in two groups ( $P > 0.05$ ), which were less than the values reported by Zhang et al. (2012) for potato pulp silage and by Baytok et al. (2005) for corn silage.

Both *in situ* OM and starch degradability values of PPS after 48 hours ruminal incubation were higher compared with corn silage ( $P < 0.05$ ). *In situ* OM and starch degradabilities for corn and potato pulp silage were 68.87 vs. 82.32% and 90.35 vs. 96.69%, respectively. Similarly, very high DM degradability values for PPS have been reported in the literature (Sugimoto et al., 2006; Sugimoto et al., 2007; Sugimoto et al., 2008; Zunong et al., 2009; Sugimoto et al., 2010). A higher *in vitro* OM digestibility values observed in the current study also supported the results of *in situ* OM and starch degradability values.

The OM and starch fractions were significantly different between the two silages. While the water soluble and non-degradable OM and starch fractions were higher, the potentially degradable OM and starch fractions were significantly less in corn silage compared with PPS ( $P < 0.05$ ). These differences were much greater in starch, which may have resulted from differences in the type of starch and the heat applied to potato during starch producing process to starch of PPS.

Substituting corn silage with increasing percentages of PPS in diet did not statistically affect daily nutrient intake in dairy cattles ( $P > 0.05$ ). Only daily NDF ( $P = 0.07$ ) and ADF ( $P = 0.08$ ) consumptions tended to be less in cows fed 45% PPS compared with cows fed corn silage. While cows fed 15% PPS had the highest DM consumption (21.28 kg) and cows fed 45% PPS had the lowest DM consumption (18.44 kg). Cows fed 45% PPS consumed 1.58 kg less DM compared with cows fed corn silage. Addition of PPS as energy source to a diet of dairy cows did not affect DMI of animal (Okine et al., 2005), which supports the results of the current study. The less daily NDF and ADF consumptions in cows fed 45% PPS were due to lower DMI and NDF and ADF contents of diet cows fed 45% PPS.

Daily milk yields and milk compositions were similar among dairy cows fed on different diets ( $P > 0.05$ ). Substitution of corn silage with PPS did not cause

any significant effect neither on daily milk yield nor milk components ( $P>0.05$ ). Daily milk yields were 21.95, 22.05, 21.95 and 21.92 L/day of cows fed 0, 15, 30, 45% PPS containing diet, respectively. Addition of PPS up to 30% into control diet numerically improved milk fat, milk protein, milk lactose and total DM contents but the addition of 45% PPS to the control diet decreased the milk fat content. This decrease in milk fat might have resulted from less daily NDF consumption of cows fed 45% PPS containing diet compared with other groups. Replacing barley or corn with PPS in diet did not alter (Schneider et al., 1985; Zunong et al., 2009) daily milk yield of dairy cows. It is well known that milk yield is more related with the genetics of animals. If animals have a good genetic potential, which can be accomplished with appropriate feeding (Ünalın and Cebeci, 2004). In this case, cows seemed to give optimal milk yield because cows fed 45% PPS diet produced the same milk yield, but dropped feed intake compared with cows fed control diet. If they have more potential they can produce more milk and consume a little bit more DM.

Substitution of corn silage with PPS did not generally alter the post-feeding ruminal pH values of dairy cows. Ruminal pH values never dropped below 6.27 at any sampling hours/groups, which were well-above the critical value of 5.5 for ruminal acidosis (Öztürk and Pişkin, 2009). Similar ruminal pH values have been reported for cows fed on PPS (Sugimoto et al., 2006; Sugimoto et al., 2008; Sugimoto et al., 2010).

Post-feeding ruminal ammonia-N levels were statistically similar among groups ( $P>0.05$ ). In general, while ruminal ammonia-N levels were the highest at 2-4 h post-feeding it was the lowest at 6 h post-feeding. The lowest ammonia-N was 16.31 mg/dL among all groups and sampling hour, which were well-above the critical level of 5 mg/dL for optimal microbial protein synthesis in the rumen (Satter and Slyter, 1974).

In general, post-feeding ruminal volatile fatty acid concentrations of cows fed on a different diet were similar ( $P>0.05$ ), except 2-h post-feeding. Generally, 0-h post feeding total VFA concentrations were the lowest in all groups, increased with feeding and then, came close back to starting levels (0-h post-feeding level) at 8-h post-feeding. Even though these increases were statistically similar among all groups and hours ( $P>0.05$ ) only total VFA level was significantly lower 2-h post-feeding in cows fed 30% PPS compared with other groups ( $P<0.05$ ). The percentages of acetic acid, propionic acid and butyric acid were generally similar among groups ( $P>0.05$ ), except 8-h post feeding propionic acid levels. Especially, percentages of acetic acid and propionic acid levels are very important for the synthesis of milk fat and lactose in a dairy cow (Tekce and Gül, 2014). The percentages of acetic acid and propionic acid ranged from 52.74 and

18.64 to 64.99 and 32.01%, respectively, for all groups and sampling times, which were at desirable levels for ideal milk fat and lactose synthesis. Sugimoto et al. (2006), Sugimoto et al. (2008) and Sugimoto et al. (2010) have reported the rather low total VFA, propionic and butyric acid levels, but higher acetic acid level compared with the results of the present study. The differences between these studies might have resulted from the carbohydrate contents of the total ration used in these experiments.

It can be concluded that PPS prepared with wheat bran and barley straw offers a very good silage quality, even better than corn silage. Substitution of corn silage with PPS up to 45% did not cause any negative effects but resulted in some positive effects on animal performance. Although cows fed PPS had 1.58 kg/day lower dry matter consumption than cows fed corn silage, there was no difference in milk yield. Substitution of corn silage with PPS did not cause any changes at the rumen fermentation parameters in dairy cows. Therefore, corn silage can be substituted by PPS upto %45 in dairy cow diets.

**Acknowledgement:** Thanks to General Directorate of Agricultural Research and Policies (TAGEM) for animal material and laboratory support.

This study is a summary of the first author's "Süt İnekleri Rasyonlarına Mısır Silajı Yerine Farklı Düzeylerde Katılan Patates Posası Silajının Süt Verimi, Süt Bileşenleri ve Rumen Uçucu Yağ Asitleri Üzerine Etkisi" title and "10163859" numbered PhD. thesis.

## References

- Aibibula Y, Okine A, Hanada M, Murata S, Okamoto M, Goto M. Effect of replacing rolled corn with potato pulp silage in grass silage-based diets on nitrogen utilization by steers. *Asian-Aust J Anim Sci* 2007; 20(8): 1215-21.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Fifteenth Edition. Washington, DC, 1990; p: 69-79.
- Bakshi MPS, Wadhwa M, Makkar HP. Waste to worth: Vegetable wastes as animal feed. *CAB Reviews* 2016; 11(12): 1-26.
- Baytok E, Aksu T, Karlı MA, Muruz H. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29(2): 469-74.
- Bingöl NT, Karlı MA, Bolat D, Akça İ. Vejetasyonun farklı dönemlerinde hasat edilen korungaya ilave edilen melas ve formik asit'in silaj kalitesi ve in

- vitro kuru madde sindirilebilirliği üzerine etkileri. *Van Vet J* 2008; 19(2): 61-6.
- Boğa M, Çevik KK. Ruminant hayvanlar için karma yem hazırlama programı. *Ondördüncü Akademik Bilişim Konferansı (AB'12)*. Şubat, 1-3, 2012; Uşak-Turkey.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A. *Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi*. Ankara: Medipress, 2002; s. 80.
- FAO. *Agricultural Statistics*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>; Accessed Date: 30.06.2020.
- Filya I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *J Dairy Sci* 2003; 86(11): 3575-81.
- Goering HK, Van Soest PJ. *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*. USDA Agr Handb, 1970; p: 14.
- Kara K, Aktuğ E, Özkaya S, Guclu BK, Baytok E. The digestion levels for ruminants of potato starch by-products: potato pulp, potato pulp with peel and potato peel. *Second International Animal Nutrition Congress*. November, 1-4, 2018; Antalya-Turkey.
- Marten GC, Barnes RF. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. *Workshop of Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. March, 12-14, 1979; IDRC, Ottawa-Canada
- Mohamadian S, Alipour D, Mahmoudi-Abyane M. Effect of different moisture absorbents on silage fermentation quality of wet potato pulp. *Iranian J Anim Sci Res* 2016; 8(2): 248-57.
- Muck RE. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Annual Meeting of American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASAE)*. 2002; 47: 1011. (doi: 10.13031/2013.9144)
- Nicholson J, Friend D. The digestibility of potato pulp protein by some species of farm animals. *Can J Anim Sci* 1965; 45(3): 141-5.
- Oda Y, Saito K, Yamauchi H, Mori M. Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Cur Mic* 2002; 45(1): 1-4.
- Okine A, Hanada M, Aıbıbulu Y, Okamoto M. Ensiling of potato pulp with or without bacterial inoculants and its effect on fermentation quality, nutrient composition and nutritive value. *Animal Feed Sci Tech* 2005; 121(3-4): 329-43.
- Öztürk H, Pişkin İ. Rumen asidozuna fizyopatolojik bakış. *Vet Hekim Der Derg* 2009; 80: 3-6.
- Pen B, Oyabu T, Hidaka S, Hidari H. Effect of potato by-products based silage on growth performance, carcass characteristics and fatty acid composition of carcass fats in holstein steers. *Asian-Australas J Anim Sci* 2005; 18(4): 490-6.
- SAS. *User's Guide version 8.2*: SAS Institute. Inc., Cary, NC, 1995.
- Satter LD, Slyter LL. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British J Nut* 1974; 32(2): 199-208.
- Schneider PL, Stokes MR, Bull LS, Walker CK. Evaluation of potato meal as a feed stuff for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1985; 68(7): 1738-43.
- Sugimoto M, Saito W, Ooi M, Sato Y, Saito T, Mori K. The effects of potato pulp and feeding level of supplements on digestibility, in situ forage degradation and ruminal fermentation in beef steers. *Anim Sci J* 2006; 77(6): 587-94.
- Sugimoto M, Chiba T, Kanamoto M, Hidari H, Kida K, Saito W, Ooi M, Sato Y, Saito T. Effects of urea treatment of potato pulp and inclusion levels of potato pulp silage in supplements on digestibility and ruminal fermentation in beef steers. *Anim Sci J* 2007; 78(6): 587-95.
- Sugimoto M, Kanamoto M, Chiba T, Hidari H, Kida K, Saito W, Ooi M, Sato Y, Saito T. The effects of protein sources supplemented with urea-treated potato pulp (pp) silage and feeding levels of the pp silage-based concentrate on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in beef steers. *Anim Sci J* 2008; 79(4): 443-52.
- Sugimoto M, Saito W, Ooi M, Sato Y, Saito T. The effects of inclusion levels of urea-treated potato pulp silage in concentrate and droughage sources on finishing performance and carcass quality in cull beef cows. *Anim Sci J* 2009; 80(3): 280-5.
- Sugimoto M, Saito W, Ooi M. The effects of urea-treated potato pulp (pp) ensiled with beet pulp or wheat bran pellets to reduce moisture of pp and flake density of corn grain supplemented with the pp silage on digestibility and ruminal fermentation in beef steers. *Anim Sci J* 2010; 81(3): 316-24.
- Tekce E, Gül M. Ruminant beslemede NDF ve ADF'nin önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2014; 9(1): 63-73.
- Tilley JM, Terry R. A Two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci* 1963; 18(2): 104-11.

- Tjardes K, Buskirk D, Allen M, Ames N, Bourquin L, Rust S. Brown midrib-3 corn silage improves digestion but not performance of growing beef steers. *J Anim Sci* 2000; 78(11): 2957-65.
- TS EN ISO 10520 2002. Native starch determination of starch content. Ewers Polarimetric Method.
- Tuncer Ş, Kocabatmaz M, Coşkun B, Şeker E. Kimyasal maddelerle muamele edilen arpa samanının sindirilme derecesinin naylon kese (nylon bag) tekniği ile tespit edilmesi. *T Vet Anim Sci J* 1989; 13: 66-81.
- Ünalın A, Cebeci Z. Siyah alaca sığırlarda ilk üç laktasyon süt verimine ait genetik parametreler ve korelasyonların reml yöntemi ile tahmini. *Turk J Vet Anim Sci* 2004; 28(6): 1043-9
- Van Soest P, Robertson J. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds standardization of analytical methodology for feeds. Pigden WJ, Balch CC, Graham M eds. In: *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. Ottawa: Proceedings IDRC, 1979; p: 49.
- Wang T, Wu Y, Jiang C, Liu Y. Solid state fermented potato pulp can be used as poultry feed. *British Poult Sci* 2010; 51(2): 229-34.
- Yaylak E, Alçiçek A. Sığır besiciliğinde ucuz bir kaba yem kaynağı: Mısır silajı. *Hayvansal Üretim* 2004; 44(2): 29-36.
- Zhang WW, Zhang YG, Liu Z. Effect of different absorbents on fermentation quality of wet potato pulp. *J Anim Vet Adv* 2012; 11(22): 4230-5.
- Zunong M, Tuerhong T, Okamoto M, Hongo A, Hana-da M. Effects of a potato pulp silage supplement on the composition of milk fatty acids when fed to grazing dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 2009; 152(1-2): 81-91.



### İyonize Radyasyonun Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi

Münevver BARAN<sup>1</sup>, Gözde Özge ÖNDER<sup>2</sup>, Özge GÖKTEPE<sup>2</sup>, Esra BALCIOĞLU<sup>2</sup>, Oğuz Galip YILDIZ<sup>3</sup>,  
Arzu YAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

**Sorumlu yazar:** Münevver BARAN; E-posta: b.munever@hotmail.com.tr; ORCID:0000-0003-0369-1022

**Atıf yapmak için:** Baran M, Önder GÖ, Göktepe Ö, Balcıoğlu E, Yıldız OG, Yay A. İyonize radyasyonun karaciğer ve böbrek dokusu üzerine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2021;18(1): 11-18

**Özet:** Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon uygulamalarının önemli komplikasyonları arasında radyasyona bağlı karaciğer ve böbrek toksisitesi bulunur. Doku ve/veya organlarda şekillenen radyasyon hasarı, alınan radyasyon dozuna bağlıdır. Bu çalışma ile farklı dozlarda verilen iyonize radyasyonun (IR) sıçan karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada, 40 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol grubu, 1Gy radyasyon grubu, 5Gy radyasyon grubu ve 10Gy radyasyon grubu şeklinde belirlendi. Radyasyon uygulamaları gama ışını kullanılarak tek doz total vücut ışınlanması şeklinde yapıldı. Gruplara ait karaciğer ve böbrek dokuları Hematoksin-Eozin (H&E), Masson trikrom ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyama ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca, kaspaz-3 immünboyama ile apoptotik hücre sayısı belirlendi. IR uygulanan karaciğer dokuları histolojik olarak incelendiğinde, radyasyon uygulanan karaciğer dokularında başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında en belirgin fibrozisin 10 Gy radyasyon uygulanan grupta olduğu gözlemlendi. Ayrıca, 5 Gy ve 10 Gy gruplarında hepatositlerin glikojen içeriğinde tükenme olduğu görüldü. Uygulanan IR, böbrek tübüllerinde ve interstisyel dokuda değişikliklere ve hücresel hasara neden oldu. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplarda kollajen liflerin miktarının arttığı ve proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ile epitel bazal membranlarında kalınlaşma olduğu görüldü. Kaspaz-3 + hücre sayısı IR'nin hem karaciğer hem de böbrek dokuları üzerinde apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, çalışma bulguları karaciğer ve böbrekte oluşan doku hasarının ve apoptotik hücre sayısının IR'da uygulanan doza bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** Apoptoz, böbrek, iyonize radyasyon, karaciğer

#### The Ionizing Radiation Effect on Liver and Kidney Tissue

**Summary:** Radiation-induced liver and kidney toxicity are among the major complications of radiation applications used in cancer treatment. Radiation damage that occurs in tissues and/or organs depends on the radiation dose received. In this study, it was aimed to evaluate the possible toxic effects of ionizing radiation (IR) given in different doses on rat liver and kidney tissue. Investigation the possible effects of different doses of ionized radiation (IR) on liver and kidney tissues. In this study, 40 female Wistar albino rats were randomly divided into 4 groups. The groups were determined as the control group, 1 Gy radiation group, 5 Gy radiation group and 10 Gy radiation group. Radiation applications were performed as a single dose of total body irradiation using gamma rays. Liver and kidney tissues of the groups were evaluated histopathologically through Hematoxylin-Eosin (H&E), Masson trichrome and Periodic acid Schiff (PAS) staining. Furthermore, the number of apoptotic cells was determined by caspase-3 immunostaining. When liver tissues treated with IR were examined histologically, various damaged cell were observed in the irradiated liver tissues, especially vascular and interstitial hemorrhage areas, and also the degree of damage was directly proportional with the radiation dose. Compared to the control group, the most prominent fibrosis was observed in the group treated with 10 Gy radiation. Furthermore, glycogen content depletion of hepatocytes was seen in 5 Gy and 10 Gy groups. The IR applied caused changes and cellular damage in the renal tubules and interstitial tissue. Especially in the 5 Gy and 10 Gy IR applied groups, the amount of collagen fibers increased and proximal tubule epithelial cells were found to have thickening of the epithelial basement membranes with marked loss of microvilli. The caspase-3 + cell count showed that IR have an apoptosis-enhancing effect on both liver and kidney tissues. As a result, the study findings revealed that the tissue damage and apoptotic cell number in the liver and kidney are dependent on the dose administered in the IR.

**Key words:** Apoptosis, ionizing radiation, kidney, liver

#### Giriş

Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon, içinden

geçtiği dokuların hücrelerinde atomlardan ve moleküllerden elektronları çıkararak iyonlar oluşturduğu için iyonlaştırıcı radyasyon (IR) olarak adlandırılır. Bu hücreleri öldürebilir veya genleri değiştirebilir, böylece hücrelerde büyümeyi durdurur. IR'nin normal dokular-

Geliş Tarihi/Submission Date : 16.07.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 02.11.2020



daki biyolojik etkileri doğrudan veya dolaylı olarak meydana gelebilir. Doğrudan etki ile radyasyon hücrenin hedef molekülü olan DNA'sını etkilerken, dolaylı etkide ise hücrelerdeki atomların iyonlaşması ve moleküler yapılarında bozulmalar görülebilir (Özgüner ve Mollaoglu, 2006). Radyasyon toksisitesi, radyasyon maruziyetinden sonra reaktif oksijen radikallerinin geniş çaplı oksidatif hasara yol açması ile ilişkilidir (Sagar, 2005). Bunun yanı sıra IR'ye maruz kalan her canlı organizmada farklı doku ve hücre tipindeki etkilenmeler, çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir (Park ve ark., 2015). IR sağlıklı biyolojik sistemlerde serbest oksijen radikallerinde artışa neden olur. Bu radikaller, hem hücrelerin DNA'sını, proteinlerini ve zar lipitlerini etkileyerek hücrede hasara neden olur, hem de antioksidan savunma mekanizmalarını olumsuz yönde etkiler. Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarını olumsuz yönde etkiler (Karbownik ve Reiter, 2000). IR'nin hücreler üzerindeki etkisi, ışınlanma dozu arttıkça hücre döngüsü bozukluğu, anormal mitoz veya hücre ölümü insidansı şeklindedir. Bu bağlamda, apoptotik hücre ölümü, hücreler IR'ye maruz kaldıktan sonraki ana hücre ölümü formlarından biri olarak kabul edilir (Verheij ve ark., 2000). Hücre ölümünü kontrol eden tüm apoptotik yollarda kritik bir role sahip olan kaspazların doğrudan aktivasyonu ile tetiklenebilir (Shinomiya, 2001). Birçok abdominal ve alt torasik tümörler için radyasyon ile tedavide karaciğer ve böbreklerin ışınlanması kaçınılmazdır (Cohen ve Robbins, 2003). Karaciğerin radyasyon toleransı oldukça sınırlıdır. Radyasyona bağlı nefropatinin histopatolojik araştırmaları, böbrek glomerüllerine, kan damarlarına, tübül epiteline ve interstisyuma zarar verdiğini göstermiştir (Cohen ve Robbins, 2003). Maruz kalınan doz ve süreye bağlı olmakla birlikte iyonlaştırıcı radyasyon verilen kemirici karaciğerinde, piknotik ve çift çekirdekli hepatosit sayısında artış olduğu görülmüştür (Sharma ve Sharma, 2005).

Hücre kültürlerinde veya laboratuvar hayvanlarında deneysel çalışmalar düşük bireysel değişkenliğe sahip populasyonlarla çalışmayı ve doğru dozdaki radyasyon dozlarını test etmeyi sağlayan radyasyonun biyolojik etkilerini değerlendirmek için bir alternatiftir. Aynı zamanda, *in vitro* sistemler, *in vivo* sistemlerle karşılaştırıldığında radyasyona farklı tepki gösterebildiğinden, laboratuvar hayvanları ile yapılan deneyler, radyasyonun etkileri ve altta yatan mekanizmaları hakkında bilgi sağlamaktadır (Duport ve ark., 2012).

Günümüzde tıp alanında IR'nin artan kullanımının bir sonucu olarak, giderek daha fazla insan, radyoterapi sırasında birkaç düzine Gy de dahil olmak üzere farklı dozlarda IR'ye maruz kalıyor. IR'ye maruziyet sonrasında alınan radyasyon dozunun organlar üzerinde nasıl bir etki oluşturduğu merak konusu olmuştur. Normal doku yaralanmalarında hem akut hem de geç toksisiteyi önlemenin yollarını bulmak büyük önem

taşımaktadır, çünkü radyasyona bağlı bu toksisiteden kaynaklanan yıkım bazen tedavi edilen ilk lezyondan çok daha kötü olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile farklı dozlarda verilen IR'nin Wistar albino sıçan karaciğer ve böbrek dokusu üzerindeki etkisinin histolojik ve immunohistokimyasal metotların kullanılması ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u tarafından 14.11.2018 tarihinde 18/140 karar no ile etik onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yetiştirilen ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 40 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar araştırma süresince 19-21°C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık sikluslu çevre, özel hazırlanmış standart laboratuvar koşullarında ve otomatik olarak klimatize edilen odalarda plastik kafeslerde korundu. Deney süresince sıçanlar normal pelet yem ile beslendi.

## Radyasyon uygulaması

Çalışmaya başlamadan önce hayvanlar her grupta 10 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Deney grupları şu şekilde belirlendi; 1) kontrol grubu; 2) tüm vücut 1 Gy radyasyona maruz kalan grup; 3) tüm vücut 5 Gy radyasyona maruz kalan grup; 4) tüm vücut 10 Gy radyasyona maruz kalan grup. Radyasyon uygulaması, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümünde Cobalt-60 teleterapi (GWXJ80-Co60 Teletherapy Unit) cihazı ile oluşturulan  $\gamma$ -ışını kullanılarak 28.5x28.5x5 cm boyutunda ve 2.5 cm derinlikte tahtadan yapılan özel bir kutu içerisinde anestezi yapmadan, 5'erli gruplar halinde, total vücut ışınlanması şeklinde yapıldı. Işınlanma sırasında sıçanların nefes almalarına izin vermek için kutunun üst kısmına delikli tray yerleştirildi. Tüm vücut ışınlanması (Villa-Genius HF-80, Çift masa, çift tüplü röntgen cihazı, 1994; Del Medical, Milan, İtalya) 15-20 miliRad16 dozunda 2 dakikalık aralıklarla uygulandı. Toplam uygulanacak doz 1 Gy, 5 Gy ve 10 Gy olacak şekilde hesaplandı.

## Histolojik boyama

Radyasyon uygulamasından 24 saat sonra ketamineksilazin (75 mg/kg-10 mg/kg) ile genel anesteziye alınan kontrol ve deney gruplarındaki tüm sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından karın bölgesi V harfi şeklinde açılarak sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları hızlıca çıkarılıp %10'luk formaldehit

ile tespit edildikten sonra dereceli olarak artan alkol serilerinden geçirilip, ksilende bekletildikten sonra eriyik parafine gömülerek bloklar elde edildi. Tüm numunelerden hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, genel histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E), fibrozis/kollajenleri değerlendirmek için Masson trikrom ve son olarak Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama metodları kullanıldı.

### **Histopatolojik değerlendirme**

Standart ışık mikroskop ile değerlendirme için H&E ile boyanmış preparatlar kullanıldı. Karaciğer hasarı konjesyon, nekroz ve yaygın nekroz olmak üzere skorlandı (Hwang ve ark., 2003). Böbrek hasarı ise radyasyona bağlı tübüler hasarsız (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli hasar (3) olmak üzere derecelendirildi (Inomata ve ark., 1999). Histopatolojik değerlendirmede tübüllerde dilatasyon, atrofi ve protein birikimi, glomerülde vakuolizasyon ve interstisyel alanda lenfosit infiltrasyonu değerlendirildi. Hem karaciğer hem de böbrek dokularında IR'nin interstisyel fibrozis etkisini belirlemek için, her denekten rastgele alınan masson trikrom ile boyanmış 20 mikroskopik alan (x200 büyütmede) değerlendirildi. Her alanda yarı kantitatif analiz şu şekilde yapıldı: 0=fibrozis yok; 1=alanın <%10'unda fibrozis; 2=alanın %10-25'inde fibrozis; 3=alanın %25-50'sinde fibrozis; 4=alanın>% 50'sinde fibrozis. İnterstisyel fibrozis derecesi, her grup için yüzde (%) olarak hesaplandı (Wang ve ark., 2016).

### **İmmünohistokimyasal boyama ve değerlendirme**

Üretici firmanın tavsiyelerine göre avidin-biotin-peroksidaz yöntemi (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak immünohistokimya boyama metodu kullanıldı. Bunun için, 5 µm kalınlığında alınan kesitler ksilende deparafinize edildi ve azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda (pH:6) mikrodalgada (750W) 10 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen kesitler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra 5 dakika Ultra V Block solüsyonu uygulanıp ardından PBS ile yıkama yapılmadan kaspaz-3 primer antikor (1:500, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands) ile 4 °C'de 1 gece nemli ortamda inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasını takiben PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitlere 10 dakika biyotinli sekonder antikor uygulandı. PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitler peroxidase-conjugated streptavidin ile 10 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi ve PBS içerisine alındı. İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, kromojen

(diaminobenzidin tetrahidroklorür, DAB) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ile görselleştirildi. Mayer's hematoksilin ile zit boyama yapılan dokular distile sudan geçirilerek dereceli alkol serileri ile dehidre edilip ksilenden geçirildi ve uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyama metodu uygulanan her bir preparat ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) altında incelendi. Deneysel grupları arasında kaspaz-3 pozitif hücre sayısını belirlemek için, her deneğe ait kesitlerden rastgele seçilen 10 farklı mikroskopik alandaki kaspaz-3 pozitif hücre sayısı sayıldı (Yay ve ark., 2018).

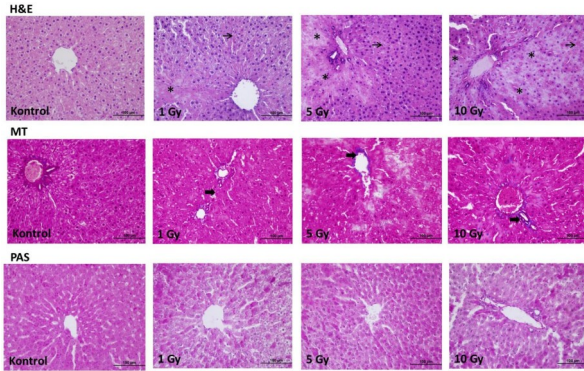
### **İstatistiksel analiz**

Tüm istatistiksel testler TURCOSA yazılım programında yapıldı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), gruplar arasında farklılığın önemli bulunduğu durumlarda Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **Bulgular**

#### **Karaciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi**

Çalışmada, ratlardan alınan karaciğer ve böbrek dokularına H&E, masson trikrom ve PAS boyama metodları uygulandı. Elde edilen sonuçlar şekil 1'de gösterilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede, radyasyon uygulanmayan kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterdi. Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları normal parankimal yapı özelliklerini sergilemişlerdir. Lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınal tarzda dizilmiş karaciğer hücreleri (hepatositler) yer almaktaydı. Hepatositler etrafında karaciğer sinüzoidleri düzgün gözlenmekteydi. Portal alanlarda ise, bağ dokusu içinde hepatik arter, ven ve safra kanalı üçlüsü yer almaktaydı. Radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. 5 Gy radyasyon uygulanan gruplara ait karaciğer kesitleri incelendiğinde kontrol grubundan farklı olarak, yoğun vasküler sinüzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinüzoidleri doldurmuş olduğu gözlemlendi. 10 Gy radyasyon uygulanan bütün deney gruplarında, yoğun nekrotik alanların bulunduğu gözlemlendi. Ayrıca vena sentralis'ten ışınal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişleme vardı (Şekil 1). Karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu radyasyon uygulanan gruplara göre en düşük skora sahipti. Radyasyon uygulanan tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre skor derecesi anlamlı düzeyde yüksekti (P<0.001) (Tablo 1).



**Şekil 1.** Kontrol grubunda ve farklı dozlarda tüm vücut  $\gamma$  ışınlaması uygulanan sıçanların karaciğer dokularında  $\times 40$ 'lık büyütmede Hematoksilen-Eozin (HE), Masson Trikrom (MT) ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması ile boyanmış kesit görüntüleri. H&E, MT ve PAS boyaması. Yıldız (\*) nekrotik alanları, ince ok ( $\rightarrow$ ) hemorajiyi, kalın ok ( $\rightarrow$ ) ise fibrozisi göstermektedir

Masson trikrom boyama ile gruplar fibrotik doku bakımından kıyaslandığında, kontrol gruplarına ait karaciğer kesitlerinde vena sentralis ve ona komşu damarların duvarında tek sıra halinde ince kollagen lifler

**Tablo 1.** Deneklere ait karaciğer ve böbrek dokularında histopatoloji ve fibrozis skor sonuçları

	Kontrol	1Gy	5Gy	10Gy	P
<b>Karaciğer histopatolojisi</b>	0.20±0.42 <sup>a</sup>	1.00±0.781 <sup>b</sup>	2.00±0.47 <sup>c</sup>	2.20±0.63 <sup>c</sup>	.001
<b>Böbrek histopatolojisi</b>	0.30±0.48 <sup>a</sup>	1.10±0.73 <sup>b</sup>	1.80±0.63 <sup>bc</sup>	2.40±0.69 <sup>c</sup>	.001
<b>Karaciğer fibrozis</b>	0.10±0.31 <sup>a</sup>	0.50±0.52 <sup>ab</sup>	1.00±0.81 <sup>b</sup>	2.00±0.81 <sup>c</sup>	.001
<b>Böbrek fibrozis</b>	0.20±0.42 <sup>a</sup>	0.90±0.73 <sup>ab</sup>	1.70±0.82 <sup>bc</sup>	2.10±0.87 <sup>c</sup>	.001

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir.  $p < 0.05$  Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

gözlemlendi. Radyasyon uygulanan gruplarda ise portal alan çevresinde kollagen liflerin, kontrol grubu ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak artmış olduğu görüldü (Şekil 1). Fibrozis 5 Gy ve 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ( $P < 0.001$ ) (Tablo 1).

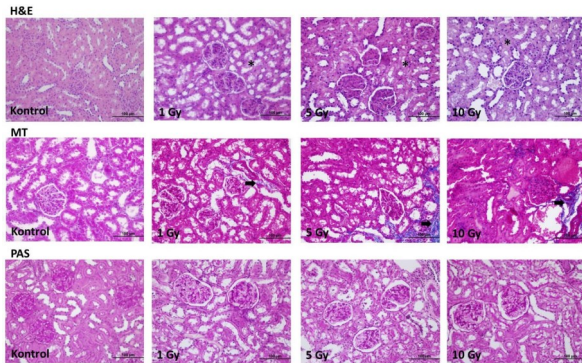
PAS ile boyanan kesitlerde kontrol grubuna ait karaciğer parankiminde yoğun glikojen içeren hepatosit kordonları gözlemlendi. Radyasyon uygulanan gruplarda ise, hepatositlerin glikojen içeriğinde tükenme olduğu dikkati çekti. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre hepatositlerin glikojen içeriklerinde anlamlı bir azalma olduğu dikkati çekti (Şekil 1).

### **Böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi**

Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapiller damarlar ve medullar ışınlar düzgün yerleşimleri ile normal görünüme sahipti. Radyasyon uygulanmayan kontrol gruplarında, glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdi. Radyasyon uygulanan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejeneratif değişiklikler sergilediği gözlemlendi. Uygulanan IR'nin tübüllerde ve interstisyel dokuda erken değişiklikleri dikkati çekti ve hücresel hasara neden olduğu görüldü. 1 Gy ve 5 Gy radyasyon grubuna ait böbrek dokularının histopatolojik incelemesinde, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji gözlemlendi. Ayrıca 10 Gy radyasyon grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu bulgulara ilaveten tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu (Şekil 2). Deney gruplarına ait böbrek dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre radyasyon uygulanan gruplarda radyasyon derecesine bağlı olarak hasarın anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ( $P < 0.001$ ) (Tablo 1).

Fibrozisi değerlendirmek için, deney gruplarına ait masson trikrom boyama metodu uygulanan böbrek kesitlerinde, kontrol grubunda belirgin bir boyanma gözlenmezken IR uygulanan deney gruplarında artmış fibrozis dikkati çekti (Şekil 2). 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplara ait böbrek dokularında interstisyel alanlarda masson trikrom ile boyanmış kollajen liflerin miktarı anlamlı derecede artmıştı ( $P < 0.001$ ) (Tablo 1).

Böbrek dokusunda tübüllerin mikrovillus yapıları ve bazal membrandaki hasarı görebilmek için, PAS boyama metodu uygulanmıştır. Kontrol grubuna ait sıçanlardan alınan böbrek dokularında tübül epitel hücreleri ve bazal membran yapıları oldukça düzgün görünümdeydi. IR uygulanan gruplarda, özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ve bowman kapsülüpariyetal yaprağı ile tübül

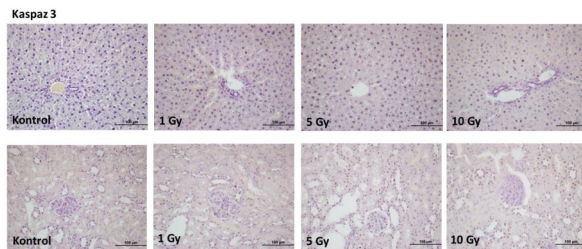


**Şekil 2.** Kontrol grubunda ve farklı dozlarda tüm vücut  $\gamma$  ışınlaması uygulanan sıçanların böbrek dokularında  $\times 40$ 'lık büyütmede Hematoksilen-Eozin (HE), Masson Trikrom (MT) ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması ile boyanmış kesit görüntüleri. H&E, MT ve PAS boyaması. Yıldız (\*) nekrotik alanları, ince ok (→) hemorajiji, kalın ok (→) ise fibrozisi göstermektedir

yapılarının bazal membranlarında kalınlaşma dikkati çekmiştir. PAS boyama metodu uyguladığımız IR gruplarında gözlenen bu bulgular özellikle 5 ve 10 Gy radyasyon uygulanan deney grubunda daha belirgindi (Şekil 2).

### İmmünohistokimyasal bulgular

Çalışmada, IR'nin karaciğer ve böbrekte oluşturduğu hasarda apoptozun herhangi bir rolünün olup olmadığını belirlemek için immünohistokimya boyama metodu kullanıldı (Şekil 3).



**Şekil 3.** Kontrol ve farklı dozlarda tüm vücut  $\gamma$  ışınlaması uygulanan grupların karaciğer ve böbrek dokularının immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 ile boyanmış kesit görüntüleri ( $\times 40$ )

Buna göre, tüm deney gruplarına ait deneklerden alınan karaciğer ve böbrek kesitlerinde  $\times 40$ 'lık büyüt-

mede her denekten 10 farklı alan olacak şekilde kaspaz-3+ hücre sayısı hesaplandı. Elde edilen istatistiksel veriler, IR'nin hem karaciğer hem de böbrek dokularında apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğunu gösterdi. Kontrol grubu karaciğer hücrelerindeki kaspaz-3 ekspresyonu IR uygulanan gruplara göre anlamlı derecede daha azdı ( $P < 0.001$ ) (Tablo 2).

### Tartışma ve Sonuç

RT birçok malignite için önemli bir tedavi yöntemidir; bununla birlikte, tümör hücrelerine bitişik olan normal dokuların ışınlanmaya maruz kalması doku hasarına neden olabilir ve bu istenmeyen etki terapötik başarıyı sınırlayabilir (Prasanna ve ark., 2012). IR, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA zincir kırıkları gibi biyokimyasal değişikliklere ve makromolekül modifikasyonlarına yol açan hücredeki çeşitli bileşenlere saldırarak DNA hasarı, genomik kararsızlık gibi çeşitli değişiklikleri teşvik ederek doku hasarının oluşmasına neden olur (Fuchs-Tarlovsky ve ark., 2013). Karaciğer hücreleri olan hepatositler, organın metabolik fonksiyonlarının çoğunu yerine getiren ve karaciğer popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluşturan başlıca parankimal hücrelerdir. Bununla birlikte, radyasyona maruz kalmanın ardından karaciğer dokusunda oluşan toksisite, ROS'ta ve hepatik hücrelerin işlev görememesine neden olan inflamatuvar belirteçlerin seviyesindeki artış gibi çeşitli patolojik değişikliklere neden olur (Benson ve ark., 2016).

RT'deki teknik gelişmelerin devam etmesine rağmen, sağlıklı dokudaki radyasyonun hem akut hem de gecikmiş yan etkileri kanser tedavisinin önündeki en önemli engellerden biri olmaya devam etmektedir (Okunieff ve ark., 2008). Kemirgenler, deneysel modeller olarak, insanlara anatomik, fizyolojik ve genetik benzerliklerinden dolayı birçok avantaja sahiptir. Ratlar, radyasyona bağlı karaciğer yaralanmalarında en çok kullanılan hayvanlardır. Wistar sıçanları ile yapılan bir çalışmada tek doz 6 Gy toplam vücut ışınlamasına maruz bırakıldığında, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres karaciğerde önemli ölçüde artmış ve malondialdehit seviyelerinin de arttığı görülmüştür (Taysi ve ark., 2003). Karaciğer radyasyon hasarı histolojik olarak parankimal hepatosit kaybı, lobüler yapıdaki bozulma, venöz obstrüksiyon ve yorgunluk, asit ve yüksek karaciğer enzimleri gibi klinik semptomların eşlik ettiği sinüzoidal konjesyonlar ile karakterizedir (Kim ve Jung, 2017). 6 Gy  $\gamma$ -ışınlarına maruz kalan sıçanlar ALT, AST, ALP ve anti-inflamatuvar belirteçlerin (TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) serum aktivitelerinde

**Tablo 2.** Deneklere ait karaciğer ve böbrek dokularında kaspaz-3 + apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması

Kaspaz-3	Kontrol	1Gy	5Gy	10Gy	P
Karaciğer	1.13 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 4.07 <sup>ab</sup>	8.93 $\pm$ 4.46 <sup>b</sup>	15.80 $\pm$ 7.86 <sup>c</sup>	.001
Böbrek	1.06 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	13.73 $\pm$ 5.95 <sup>b</sup>	12.66 $\pm$ 4.25 <sup>b</sup>	26.53 $\pm$ 6.70 <sup>c</sup>	.001

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir.  $p < 0.05$  Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

artış göstermiş ve histopatolojik inceleme ile gösterildiğinde hepatik mimarinin değişmesine neden olmuştur (Mansour ve ark., 2017). Birinci ve yedinci günlerinde 30 dakika süre ile Kobalt 60- $\gamma$  (1,333 MeV) ışını ile 10 Gy dozunda radyasyona maruz bırakılan farelerin karaciğerinde proliferen olan hepatosit sayısında azalmaya ve çift çekirdekli hepatosit sayısında artışa neden olduğu görülmüştür (Karahana ve ark., 2008). Tek doz 6 Gy radyasyona maruz kalan sıçanların 48 saat sonra sakrifiye edilen karaciğer dokuları hiçbir histopatolojik değişiklik görülmeden kontrol grubu ile kıyaslandığında fokal dejenerasyon alanları, tıkalı ve genişlemiş sinüzoidler görülmüştür (Salem ve ark., 2016). 7.2 Gy'lık tek bir dozda tüm vücut  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radyasyonuna maruz kalan insan dışı primatlar da 60 günlük süre içerisinde böbrek ve karaciğerde dokularında güçlü metabolik değişiklikler görülürken diğer dokularda hafif değişiklikler gözlenmiştir (Cheema ve ark., 2019). Çalışmamızda ise farklı dozlarda (1Gy, 5Gy ve 10 Gy) radyasyon uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilen karaciğer dokuları kontrol grubu ile kıyaslandığında vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücre hasarları gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. 5 Gy radyasyon uygulanan gruplarda yoğun vasküler sinüzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinüzoidleri doldurmuş olduğu gözlenirken 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda ise yoğun nekrotik hücreler ve vena sentralis'ten ışınal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişlemeler olduğu görülmüştür. Ayrıca, IR uygulanan gruplarda, radyasyon dozuna paralel olacak şekilde fibrozis artışı ve hepatositlerde glikojen içeriğinde tükenme olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmada, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak farklı dozlarda tek doz uygulanan tüm vücut ışınlanmasından 24 saat sonra bile sakrifiye edilen karaciğer ve böbrek dokularında hasar meydana geldiği gözlenmiş oldu.

Böbrek, vücudun detoksifikasyon, toksik metabolitlerin ve ilaçların atılması gibi birkaç temel işlevi yapması için gerekli olan önemli bir organdır. Karın malignitesi olan hastalarda, böbrek ışınlanması kaçınılmazdır (Ismail ve ark., 2016). Tedavi sürecinde, düşük doza rağmen radyosensitif organlarda gelişen duyarlılık da dikkate alınmalıdır. Bu organlar arasında en önemli unsur böbrek dokusudur. Bu dokudaki patolojik değişiklikler, dozaj düşük olsa bile hemen başlar (Caloglu ve ark., 2009). Radyasyon nefropatisi perfüzyon bozukluğunu, artmış damar geçirgenliğini ve inflamatuvar reaksiyonları içerir, bu durum hayatı tehdit edici olabilir (Cohen ve Robbins, 2003). Yüksek dozda 20 Gy ışınlanmanın böbrek hasarına neden olabileceğini bildirmiştir (Kucuktulu, 2012). Bir başka çalışmada düşük dozda (4-5 Gy) ışınlanmanın dahi önemli böbrek hasarına neden olabileceği gösterilmiştir (Moulder ve Cohen, 2005). Radyasyona bağlı nefropatinin histopatolojik olarak incelendiği araştırmalarda, glomerüllerde, kan damarlarında, tübül epitel hücrelerinde

ve interstisyumda hasara neden olduğu gösterilmiştir (Cohen ve Robbins, 2003). Çalışmamızda IR uygulanan böbrek dokularında hem tübüllerde ve hem de interstisyel dokuda değişikliklere neden olduğunu belirledik. Özellikle 5 ve 10 Gy radyasyona maruz kalan böbrek dokularında, belirgin hemoraji, glomerüllerde ve tübül hücrelerinde hasar mevcuttu. Çalışmamızda, farklı dozlarda IR'ye maruz kalan böbrek dokularında kontrole göre artmış fibrozis gözlemlendi. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplara ait böbrek dokularında interstisyel alanlarda kollajen liflerin miktarı artmıştı. Ayrıca, PAS boyama metodu ile boyanan böbrek kesitlerinde IR uyguladığımız gruplarda proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ve bazal membranlarında kalınlaşma dikkati çekti.

Radyasyonun, hücre ölümü ve kemirgenlerde fibrotik değişikliklerle karakterize karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir (Kim ve Yung, 2017). Hücreler IR'ye maruz kaldıktan sonraki ana hücre ölümü formlarından biri olan apoptotik hücre ölümüne yol açar (Verheij ve Bartelink, 2000). Kaspazlar, substratlarını aspartat tortusunda parçalayan, hücrede apoptoz ve iltihaplanmada önemli rol oynayan bir sisten proteaz ailesidir (Martinon ve ark., 2004). İlginç bir şekilde, yüksek dozlarda (4Gy veya 8Gy) akut olarak ışınlanan fareler, inflamasyonla ilgili proteinlerin ekspresyonunda kalıcı değişiklikler gösterirken, uzun vadeli radyasyonla toplam 8Gy dozu, apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunda değişikliğine neden olduğu görülmüştür (Nakajima ve ark., 2017). 10 Gy radyasyona maruz kalan karaciğer dokusunda Western blot analizi ile kaspaz-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde tıpkı bizim çalışmamızdaki gibi iyonize radyasyondan sonra 1. günde bile bir artış olduğu gözlenmiştir (Han ve ark., 2019). Çalışmamızda IR'ye maruz kalan hem karaciğer hem de böbrek dokularında kontrole göre kaspaz-3 pozitif hücre sayısı artışı ve en fazla kaspaz-3 pozitif hücre sayısı 10 Gy IR grubunda görülmüştür. Bu da bize radyasyon dozuna bağlı olarak radyosensitif olan karaciğer ve böbrek dokularında hücre ölümünün tetiklendiğini gösterdi.

Dokuların radyasyona karşı oluşturdukları hücre cevapları farklılık göstermektedir. Günümüzde radyasyon içeren uygulamaların sıklığı, kullanılan dozlar ve buna bağlı doku hasarları görülme olasılığı giderek artmaktadır. RT uygulanan pek çok onkolojik vakada, RT alanına karaciğer ve böbreklerin girmesi, bu organlar üzerinde olumsuz etki oluşturabilmektedir. IR'nin organizma üzerindeki etkileri birçok faktöre bağlı olup geniş bir çerçevede incelenebilir. Bu çalışmadaki amacımız farklı dozlardaki IR'nin karaciğer ve böbrek dokusunda hücreler üzerinde yaptığı etkileri değerlendirmektir. Sonuçlarımıza göre, hastaya uygulanacak radyasyon dozunun mümkün olduğunca az tutulmasına rağmen hastada radyasyon hasarı oluşurma olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenle asıl uygulama alanı dışında bırakılması mümkün olmayan bu

organları korumaya yönelik farklı yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

### Kaynaklar

- Benson R, Madan R, Kilambi R, Chander S. Radiation induced liver disease: A clinical update. *J Egypt Natl Canc Inst* 2016; 28(1): 7-11.
- Caloglu M, Yurut-Caloglu V, Durmus-Altun G, Oz-Puyan F, Ustun F, Cosar-Alas R, Saynak M, Parlar S, Turan FN, Uzal C. Histopathological and scintigraphic comparisons of the protective effects of L-carnitine and amifostine against radiation-induced late renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(5-6): 523-30.
- Cheema AK, Mehta KY, Rajagopal MU, Wise SY, Fatanmi OO, Singh VK. Metabolomic studies of tissue injury in nonhuman primates exposed to gamma-radiation. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13): 3360.
- Cohen EP, Robbins ME. Radiation nephropathy. *Semin Nephrol* 2003; 23(5): 486-99.
- Duport P, Jiang H, Shilnikova NS, Krewski D, Zielinski JM. Database of radiogenic cancer in experimental animals exposed to low doses of ionizing radiation. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2012; 15(3): 186-209.
- Fuchs-Tarlovsky V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutri* 2013; 29(1): 15-21.
- Han N-K, Jung MG, Jeong YJ, Son Y, Han SC, Park S, Lim Y-B, Lee Y-J, Kim S-H, Park SC, Lee H-J. Plasma fibrinogen-like 1 as a potential biomarker for radiation-induced liver injury. *Cells* 2019; 8(9): 1042.
- Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai LM. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res* 2003; 109(2): 149-54.
- Inomata T, Itoh S, Kariya S, Mesaki K, Nishioka A, Ogawa Y, Yoshida S, Sonobe H, Ohtsuki Y. Late pathologic changes in guinea pig kidneys irradiated with conventional fractionation and hyperfractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44(1): 171-7.
- Ismail AF, Zaher NH, El-Hossary EM, El-Gazzar MG. Modulatory effects of new curcumin analogues on gamma-irradiation-induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2016; 260: 141-53.
- Karahan S, Çavuşoğlu K, Atmaca HT, Yalçın E. Albino farelerde iyonlaştırıcı radyasyonun hepatosit morfolojisi ve proliferasyon hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerindeki etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2008; 5(2): 61-6.
- Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225(1): 9-22.
- Kim J, Jung Y. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives. *Exp Mol Med* 2017; 49(7): e359
- Kucuktulu E. Protective effect of melatonin against radiation induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(8): 4101-5.
- Mansour SZ, El-Marakby SM, Moawed FSM. Ameliorative effects of rutin on hepatic encephalopathy-induced by thioacetamide or gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B* 2017; 172: 20-7.
- Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117(5): 561-74.
- Moulder JE, Cohen EP. Radiation-induced multi-organ involvement and failure: The contribution of radiation effects on the renal system. *Br J Radiol* 2005; 27(1): 82-8.
- Nakajima T, Wang B, Ono T, Uehara Y, Nakamura S, Ichinohe K, Braga-Tanaka I, Tanaka S, Tanaka K, Neno M. Differences in sustained alterations in protein expression between livers of mice exposed to high-dose-rate and low-dose-rate radiation. *J Radiat Res* 2017; 58(4): 421-9.
- Park HS, You GE, Yang KH, Kim JY, An S, Song JY, Lee S-J, Lim Y-K, Nam SY. Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *Eur J Cell Biol* 2015; 94(12): 653-60.
- Okunieff P, Chen, Maguire D, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(3): 363-74
- Özgüner F, Mollaoglu H. Manyetik alanın organizma üzerindeki biyolojik etkileri. *Med J SDU* 2006; 13(1): 38-41.
- Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B, Coleman CN. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? *Transl Cancer Res* 2012; 1(1): 35- 48.
- Salem AM, Mohammaden TF, Ali MA, Mohamed EA, Hassan HF. Ellagic and ferulic acids alleviate gamma radiation and aluminium chloride-induced oxidative damage. *Life Sci* 2016; 160: 2-11.

- Sagar SM. Should patients take or avoid antioxidant supplements during anticancer therapy? An evidence-based review. *Curr Oncol* 2005; 12(2): 44-54.
- Sharma R, Sharma J. Modification of gamma ray induced changes in the mouse hepatocytes by *Centella asiatica* extract: In vivo studies. *Phytother Res* 2005; 19(7): 605-11.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis:premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis. *J Cell Mol Med* 2001; 5(3): 240-53.
- Taysi S, Koc M, Büyükokuroğlu ME, Altinkaynak K, Sahin YN. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *J Pineal Res* 2003; 34(3): 173-7.
- Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 133-42.
- Wang M-J, Ling W-W, Wang H, Meng L-W, Cai H, Peng B. Non-invasive evaluation of liver stiffness after splenectomy in rabbits with CCl4-induced liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2016; 22(46): 10166-79.
- Yay A, Goktepe O, Bahadir A, Ozdamar S, Oktem IS, Coruh A, Baran M. Assessment of markers expressed in human hair follicles according to different skin regions. *Adv Clin Exp Med* 2018; 27(7): 929-39.



## Ocular Lesions and Neurologic Findings in Traumatic Birds: A Retrospective Evaluation of 114 Cases

Aynur DEMİR<sup>1</sup>, Kübra GERBAGA OZSEMİR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Istanbul-TURKEY

<sup>2</sup>Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Istanbul-TURKEY

**Corresponding author:** Aynur Demir; E-mail: aynurdemir\_1903@hotmail.com; ORCID 0000-0002-5471-1655

**How to cite:** Demir A, Gerbaga Ozsemir K. Ocular lesions and neurologic findings in traumatic birds: A retrospective evaluation of 114 cases. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2021; 18(1):19-25

**Summary:** This study was conducted to identify the occurrence and types of trauma-related ocular disorders in 114 birds belonging to 39 species. For this purpose, both detailed neurological examination and ophthalmologic examination results of the birds admitted to our clinics with a trauma history or trauma findings are presented. Thirty cases were evaluated to suffer from trauma-related eye injuries. Uvea lesions (n=12) were the most frequent disorder of traumatic eye injury. On cranial nerve assessment, anisocoria, pupillary light reflex, menace response, globe and third eyelid position, palpebral reflex, and nystagmus were evaluated. The most frequent neurologic finding of traumatic eye injury was anisocoria (n=9). Ophthalmologic examination accompanying neurological examination is the most important factor in the early management of traumatic birds.

**Key words:** Bird, cranial nerve assessment, treatment, traumatic eye injuries, uvea

### Travmatik Kuşlarda Oküler Lezyonlar ve Nörolojik Bulguları: 114 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi

**Özet:** Bu çalışma, 39 türe ait 114 kuşta travmaya bağlı göz bozukluklarının oluşumunu ve tiplerini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla kliniğimize travma öyküsü veya travma bulguları ile başvuran kuşların hem detaylı nörolojik muayene hem de oftalmolojik muayene sonuçları sunulmuştur. Otuz vaka travmaya bağlı göz yaralanmalarından muzdarip olarak değerlendirildi. Uvea lezyonları (n=12) en sık travmatik göz yaralanması bozukluğuydu. Kranial sinir değerlendirmesinde anizokori, pupiller ışık refleksi, tehdit yanıtı, glob ve üçüncü göz kapağı pozisyonu, palpebral refleks ve nistagmus değerlendirildi. Travmatik göz yaralanmasının en sık görülen nörolojik bulgusu anizokoriydi (n=9). Nörolojik muayeneye eşlik eden oftalmolojik muayene, travmatik kuşların erken tedavisindeki en önemli faktördür.

**Anahtar kelimeler:** Kuş, cranial sinir değerlendirmesi, tedavi, travmatik göz hasarı, üvea

### Introduction

Vision is often one of the five senses necessary for the social interaction between living animals and for raptors to survive, fly, find and seek food, understand the changing environment, and understand sexual selection and reproductive behavior (HoltandLayne, 2008; Moore et al., 2017). Especially for the nocturnal raptors hunting at night, the senses of vision and hearing are necessary to survive in the wild life (Seruca et al., 2012). Birds have large eyeballs relative to their body mass, with a strong siliar attachment to the lens, scleral bone and cartilage, thin cornea, large posterior segment, vascular pecten and avascular retina, and complete chiasm of optic nerve fibers (Davidson, 1997; Holtand Layne, 2008). Although the morphological structure of the bird eyes has been adjusted for high visual function, due to their ocular anatomy and unfavorable environmental conditions, especially free-living raptors are very vulnerable to ocular lesions, and trauma is the most common cause of

ocular morbidity in these birds (Murphy et al., 1982; Bayon et al., 2007). The combination of these ocular features in birds contributes to the formation of a pathological process due to ocular trauma (Holt and Layne, 2008; Hudecki and Finegan, 2018). The majority of ocular injuries in free-living or captive wild animals are reported to be due to blunt or penetrating traumas (Moore et al., 2017). Blunt traumas are the most common eye injuries and occur as a result of hitting objects, such as parked or moving cars, windows, trees, and buildings during hunting and/or migration (Murphy et al., 1982; Davidson, 1997). It is also reported that more than 30% of traumatized birds have simultaneous ocular trauma findings (Seruca et al., 2012; Moore et al., 2017). Ocular lesions after trauma vary between bird species according to the anatomical structure, feeding style, and living conditions (Murphy et al., 1982). These ocular lesions affect retinal illumination, visual acuity, perception of depth, and binocular vision and cause negative changes in living conditions (Holt and Layne, 2008). The accurate and timely diagnosis and treatment of these lesions is, therefore, very



important for free-living organisms.

The aim of this study was to evaluate the distribution of species, the causes of trauma, and the relationship between trauma and ocular disorders in traumatic birds admitted to the emergency department of an animal hospital.

### Materials and Methods

This was a retrospective study of clinical case records to identify trauma-related ocular lesions and neurologic findings of 114 birds of different species and ages admitted to the Small Animal Emergency Department of İstanbul University from January 2017 to February 2020. First of all, from the people who presented the bird to us, what exactly it was, why it was and the detailed information about the bird was taken. The type of trauma was divided into two as blunt or penetrating, and the ocular trauma cases were classified according to disease duration (e.g., acute and chronic) and based on anamnesis and/or pathological features, but the exact mechanism and history of injury could not be determined for most birds. In the clinical assessment of the birds, after physical evaluation by inspection, palpation, and if necessary radiography, the examination of the cranial nerves and a detailed ophthalmological examination were also undertaken in cases with visual impairment or ocular lesion findings. At the first assessment, the patient's posture, mental status, movements, and gait were observed remotely. Anisocoria, pupillary light reflex, menace response, globe and third eyelid position, palpebral reflex, and nystagmus reflexes were evaluated in the functional examination of cranial nerves. In cases showing physical signs of cranial trauma with an unknown etiology, a complete radiographic examination was performed to determine whether there was gunshot injury. The ophthalmic assessment started with a close examination of the skin of the eyelids, the integrity of the orbit and the position of the eyeball. Orbita, eyelid and bulbus injury, visual acuity of both eyes, response to light, anterior and posterior segments were evaluated. The presence of visual acuity, menace and pupil (direct and indirect) light reflex, the birds' ability to follow moving objects, and their attempt to peck an approaching object were determined based on their movement in the cage. Fluorescein staining was used to identify corneal erosions or ulcers in a dark room. The problems related to the cornea were evaluated by changing the discoloration and smoothness of the surface.

The course of the disease was assessed as acute or chronic according to the changes observed in ocular tissues. In eyelid lacerations, the presence of fresh hemorrhage or exudate, new appearance of wound lips, acute rupture, swelling of wound edges, cicatricial deformations, and presence of scar tissue were evaluated as chronic. Acute anterior uveitis, fibrin and

active bleeding in the anterior chamber (Figure 1);



**Figure 1.** Diffuse iris neovascularisation with hyphema in Eurasian eagle-owl (*Bubo bubo*) 5 days after blunt trauma

chronic uveitis were accepted according to the presence of pupillary anterior or posterior synechia, fibrosis, and anterior segment deformities (Figure 2).



**Figure 2.** Two weeks after blunt trauma, hyphema resolution and pupillary irregularity and posterior synechia at 7 o'clock in a honey buzzard (*Pernis apivorus*)

In addition, multiple injuries (soft tissue injuries, fractures, torticollis, ear bleeding, etc.) with or without ocular findings were also identified in most of the cases.

The patients were treated with topical and systemic antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory, antiglaucomatous drugs and fluids according to the injury. In cases of corneal perforation, the ruptured corneal region with 8/0 polyglactin 910 was closed with simple separate stitches and covered by tarsorrhaphy. During treatment, most of the birds were closely monitored for possible complications. During the follow-

up, a detailed eye examination was performed, and the visual results were recorded.

**Ethical approval:** The conducted research is not related to animals use. No ethical approval was obtained because this study did not involve laboratory animals and only involved non-invasive procedures (e.g. collection of waste tissue after surgery, fecal samples, voided urine etc).

**Results**

In this study, a total of 114 cases, of which 102 were wild 8 (free-living) and 12 were cage birds (captive birds), were evaluated. The trauma-induced ocular lesions were examined in birds of 39 different species. Of the 114 birds in the records, 30 (26.3%) had an ocular problem at admission. Ocular lesions were detected in 10 (8.7%) out of 12 cage birds and 20 (17.5%) out of 102 wild birds due to trauma. Most of the cases (89.4%), which were considered to have findings compatible with traumatic ocular damage, were found to be free-living birds.

Of the birds diagnosed with traumatic injuries (n = 114), four had been hit by a car, 18 had other blunt trauma injuries, 13 had injuries inflicted by other animals (predators), four had gunshot injuries, and 76 had an unknown etiology. The species and injuries were classified according to trauma outcomes as shown in Table 1.

**Table 1.** Species and distribution of injuries (n=114)

Species	Number of cases	Type of injury
Yellow legged gull ( <i>Larus michahellis</i> )	21	f
Tawny owl ( <i>Strix aluco</i> )	4	o,f
Honey buzzard ( <i>Pernis apivorus</i> )	3	o,f
Nightjar ( <i>Caprimulgus europaeus</i> )	3	o,f,st
Pigeon	10	o, f, st
Little owl ( <i>Athene noctua</i> )	3	o,f
Laughing dove ( <i>Spilopelia senegalensis</i> )	4	f, st
Stork ( <i>Ciconia ciconia</i> )	10	o,f,st
Common buzzard ( <i>Buteo buteo</i> )	10	o,f
Hooded crow ( <i>Corvus cornix</i> )	3	f
Cage birds	12	o,st,t
All other species	31	o,f, st,t,i

f: fracture, i: immobile, o: ocular lesion, st: soft tissue injury, t: torticollis

Larger species (e.g., storks and the honey buzzard) suffered from blunt trauma injuries, whereas smaller species (e.g., nightjars and the laughing dove) suffered from those penetrating trauma caused by predators. For the vast majority of free-living birds, the reason for trauma could not be determined because they had been found and brought to the clinic by citizens after the event. According to the anamnesis and clinical data, 25% of the ocular lesions seen in cage birds were due to the attack of other animals (Figure 3), and 75% were due to blunt trauma (hitting a mir-

ror, cage, chandelier, etc.) (Figure 4).



**Figure 3.** Periorbital ecchymosis, eyelid laceration and mucopurulent discharge in a cockatiel after cat attack

Secondary traumatic non-ocular lesions (i.e., soft tissue injury, limb fractures, or torticollis) constituted seven of 30 traumatic cases (23.3%).

Of all the ocular lesions, 86.6% involved the anterior segment, 13.3% involved the posterior segment, and 3.3% involved both segments (Table 2).

In cases with traumatic ocular lesions (n=30), the eyelids and the periorbital and conjunctival regions were affected in 10/30, cornea in seven, anterior chamber, iris and pupilla in twelve, lens in two, posterior segment in three. In addition, both eyelids, the conjunctiva, and the anterior chamber were affected in one bird, the cornea and iris in two cases, iris and lens in one case, and the anterior and posterior uvea in a further case. According to the order of incidence, there was hyphema in 12 of 30 cases, periorbital



**Figure 4.** Periorbital and conjunctival hemorrhage in right eye in a budgerigar

**Table 2.** Distribution of ophthalmic disorders

Eyelid- Conjunctiva		Cornea		Uvea	Lens	Retina
Palpebral laceration	Conjunctivitis	Ulcer	Perforation	HypHEMA	Cataract	Retinal dekolman
4	6	5	2	12	2	2

swelling in eight, corneal ulcer in five, corneal perforation in two, palpebral laceration in four, and cataract two. HypHEMA accounted for 40% of all ocular problems and was the most common lesion in this study (Figure 5).



**Figure 5.** The appearance of hyphema, pupillary occlusion and cataract after 1 week in the left eye after blunt trauma in a common buzzard (*Buteo buteo*)

Hyphema developed due to blunt trauma in nine cases and penetrating trauma in three. Except for 2 cases, the other 10 cases were observed due to penetrating trauma in both hyphema-free birds and both cage birds. The ocular lesions were caused by blunt trauma in nine of the free-living birds. The causes of

ocular trauma also varied between species. In nine of the cases, the lesion was determined to have been due to penetrating trauma, and in 21, it was caused by blunt trauma according to the birds' history and clinical examination findings.

Corneal erosions/superficial ulcers were typically focal and cleared without vascularization or signs of infection. Of the seven cases with corneal lesions (two caged and five free-living), five had superficial ulcers in the cornea (Figure 6), one had a descemetocle, and one had a corneal rupture.

The cataracts were unilateral in both cases and developed secondary to uveitis and hyphema after trauma to the eye. In uveitis, hyphema was observed in most cases, and fibrin in the anterior segment in some cases. Most of the patients with uveitis also had a low intraocular pressure .

At least one cranial nerve dysfunction was also diagnosed in all patients with ocular problems (Figure 7).



**Figure 6.** Central cornea ulcer in the left eye in a common king fisher (*Alcedo atthis*) with positive fluorescence staining



**Figure 7.** Anisocoria after head injury in a little owl (*Athene noctua*). Left eye pupil size normal, right one is miotic

In two cases, globe position, pupillary light reflex, third eyelid position, anisocoria, and nystagmus could not be evaluated due to periocular edema and swelling. The cranial nerve assessment findings are presented in Table 3.

trauma lesions in owls are more common compared to other birds of prey due to the anatomical and orbital structure of their eyes (Murphy et al., 1982). In addition, traumatic ocular lesions occur in cage birds due to the unsuitable environment (Murphy et al., 1982). In our study, 26.3% (30/114) of the birds ex-

**Table 3:** Outlines used in birds to evaluate the function of cranial nerves and results of examination (Cranial nerve assessment adapted from Clippinger et al. (2007))

Assessment	Function / dysfunction	Neurological structures	Results of examination
Menace	Eyelids close in response to Perceived threat	Optic nerve (CN II) Trigeminal nerve (CN V)	Positively in 23 cases, negatively in 7 cases
Pupillary Light Reflex	Pupil constricts in response to focused light source	Optic nerve (CN II) Oculomotor (CN III)	Positively in 20 cases, negatively in 8 cases, unevaluated in 2 cases
Globe Position	Centrally located and normally responsive pupil/ Ventrolateral deviation (CN III), Dorsolateral deviation (CN IV), Medial deviation(CN VI)	Oculomotor nerve (CN III), Trochlear nerve (CN IV), Abducens (CN VI)	Evaluated normally in 28 cases and unevaluated in 2 cases
Third eyelid Position	Normal retracted position	Abducens nerve (CN VI)	Retracted in 26 cases, protrusion observed in 2 cases, unevaluated in 2 cases
Palpebral reflex	Blink in response to touching the medial canthus	Trigeminal nerve (CN V)	Positively in 25 cases, negatively in 5 cases
Facial Expression	Normal symmetry of the face	Facial nerve (CN VII)	Normal in 30 cases
Nystagmus	Normal physiologic nystagmus with fast phase in direction of horizontal movement.	Vestibulocochlear nerve (CN VIII) Brainstem	Positively in 2 cases, negatively in 26 cases, unevaluated in 2 cases

Damage to tissues caused by trauma was treated medically and operatively. Tarsorrhaphy was performed in one case due to the deep corneal ulcer. In five cases with corneal ulcers, medical methods were used in treatment because the lesion was superficial. The majority of the birds were closely monitored during the treatment for possible complications, while the owned birds were followed up at one-week intervals. The birds were released to nature after applying appropriate treatment determined according to ophthalmologic findings and vision ability.

**Discussion**

One of the most important causes of eye loss in free-living birds is ocular or periocular injury (Seruca et al., 2012). Ocular injury is a common component of avian head trauma, observed in more than 30% of traumatized birds (Seruca et al., 2012), due to the exaggerated orbit accommodating proportionally large eyes and their scleral ossicles (Jolly, 2015). The causes of traumatic ocular findings vary according to the morphological and hunting patterns of birds and ecological conditions (Murphy et al., 1982). They occur when birds flying to hunt or migrate hit objects, such as buildings, trees, and cars (Seruca et al., 2012; Moore et al., 2017). Some studies have reported that ocular

posed to trauma also had ocular trauma findings. It was determined that ocular lesions were observed mostly in owls (16.6%; 5/30) among free-living birds, and budgerigars were the most common sufferers of ocular lesions among cage birds. Ocular lesions due to trauma in cage birds were mostly caused by striking objects, such as mirrors, cabinets, doors, and being attacked by another animal.

Trauma causes acute and chronic lesions in the eye and is classified as blunt or penetrating depending on the type and cause and may result in damage to different ocular components at different frequencies, resulting in multiple ophthalmic lesions, such as peri-orbital swelling, corneal ulcer, uveitis, corneal perforation, hyphema, iris prolapse, retinal detachment, lens capsule rupture, and scleral ossicular damage (Willis and Willie, 1999; Moore et al., 2017). It has been reported that blunt trauma during a collision is a more common traumatic injury in birds (Murphy et al., 1982; Davidson, 1997; Moore et al., 2017; Hudecki and Finegan, 2018). The damage to the eye by blunt trauma varies depending on the anatomical and physical structure of the eyeball (Williams, 2006). Scleral oscillate and cartilage integration of birds' eyes provides a more stiff structure than collagen-rich

mammalian eyes (Murphy et al., 1982; Holt and Layne, 2008; Moore et al., 2017). This rigid eyeball increases the amount of kinetic energy delivered to the sensitive uvea and/or retina due to head trauma in birds (Murphy et al., 1982; Holt and Layne, 2008; Moore et al., 2017). As a result, severe damage to the uvea and retinal layer develops. Due to this ocular structure, anterior uveitis and secondary cataracts are among the most common findings in birds (Murphy et al., 1982; Holt and Layne, 2008). In some studies, it has been reported that corneal diseases are seen frequently, especially in migratory songbirds (Moore et al., 2017). Corneal ulcers and perforations are more common in wild birds during accidental collisions. Hudecki and Finegan, (2018) found that corneal ulcers due to trauma were the most common eye lesions in this bird species. In this study, the uvea was the most affected ocular structure (14/30) and hyphema secondary to trauma was the most reported uveal disorder (12/14). In addition, ocular lesions were detected in 10 (83%) of 12 cage birds and 20 (19.6%) of 102 wild birds among traumatic cases. These results showed that ocular damage due to trauma was more common in cage birds. The data obtained are consistent with the results reported by Willis and Wilkie, 1999. Furthermore, trauma-related ocular lesions were reported in approximately 14% of 931 injuries of wild raptors admitted to avian clinics in North America (Holt and Layne, 2008). Orbital and periorbital trauma causes acute inflammation in the eye and disruption of the blood-aqueous barrier in the uveal layer. Inflammatory and blood cells accumulate acutely in the anterior chamber (Davidson, 1997). It is determined by pain-related blepharospasm, low intraocular pressure, iridal hyperemia, and the presence of varying degrees of a mycotic or dyscopic pupil. One of the most common ocular signs of uveitis in birds is hyphema, defined as the accumulation of blood cells in the anterior chamber (Hausmann et al., 2016). This is also one of the intraocular symptoms of severe ocular trauma. The presence of hyphema indicates that the structures of the anterior and posterior segments of the eye have been subject to serious injuries. It is the most common clinical findings of traumatic ocular lesions in free-living raptors and humans (Davidson, 1997). If hyphema is not complicated, it is usually absorbed and cleared within a few days to two weeks. However, sometimes it causes adhesion to the surrounding tissues in the pupillary iris region (Hausmann et al., 2016). The adhesion of the inflammatory cells that appear as a result of inflammation in the traumatic iris to the lens anterior capsule can cause cataract formation due to focal uveal pigment deposition on the lens and secondary nutritional defect in the lens (Davidson, 1997; Hausmann et al., 2016). In our study, hyphema was the most common eye finding, and it was seen mostly in free-living bird species. In some of the cases, pupillary deformity in the form of dyscoria due to chronic uvei-

itis and secondary cataract formation were observed.

Cataract has been reported to develop in birds in association with skeletal malformations, genetic disorders, age, malnutrition, infection, trauma, toxic effects, and other ocular diseases, such as uveitis and retinal degeneration (Bayon, 2007). Cage birds, including macaws, cockatiel, amazon parrots, and canaries are genetically susceptible to cataract formation (Willis and Willie, 1999; Hvenegaard et al., 2009; Williams, 2017). However, it is reported that cataract can develop in free-living birds due to trauma-induced uveitis and hyphema (Murphy et al., 1982). Williams, (2017) noted that post-traumatic lens opacities were possible causes of cataract in free-living birds. Cataract is mostly observed as a secondary condition among bird species, especially in owls that continue free living after blunt trauma (Holt and Layne, 2008; Moore et al., 2017). Secondary cataract develops mostly in large and severe iridal tissue damage. It should be distinguished from cataract cases due to old age and genetics (Williams, 2017). In our study, two wild bird species, one little owl (*Athenenoctua*) and one common buzzard (*Buteobuteo*), were diagnosed with lens opacity ranging from the accumulation of inflammatory cells and focal opacity in the anterior capsule of the lens to mature cataracts. In both birds, this secondary lens pathology was observed simultaneously with an adnexal posttraumatic pathology or significant uveitic inflammatory changes (inflammatory cell and/or hyphema) (Holt and Layne, 2008; Moore et al., 2017). Behavioral changes in birds were not significant except for the loss of threat reflex in the affected eye. Perforated injuries cause secondary intraocular infections due to the loss of corneal barrier, and even endophthalmitis, which causes the loss of the eyeball (Williams, 2006). In perforated wounds, the cornea is affected, as well as the intraocular structures of the iris and lens, depending on the condition of the agent and presence of inflammation or blood cells in the anterior chamber (Davidson, 1997). In addition, severe penetrating trauma can damage the ciliary body, resulting in a decrease in aqueous humor production and the shrinking of the eyeball, called phthisis bulbi (Davidson, 1997; Murray et al, 2013). Phthisis bulbi is associated with other severe ocular injuries that cause blindness. Since it is a painless condition, enucleation is often not required unless secondary entropion and ocular discharge are present (Davidson, 1997; Murray et al., 2013).

Traumatic uveitis and other traumatic intraocular changes sometimes occur in the iridocorneal angle, resulting in chronic glaucoma formation (Davidson, 1997; Hausmann et al., 2016). Glaucoma is a common complication of ocular blunt trauma in humans but relatively rare in birds (Davidson, 1997). Its appearance is noticeable with a larger sphere size than the normal eyeball due to the increased intraocular

pressure (Hvenegaard et al., 2009). Since it is a very painful condition, eye enucleation is recommended in patients who do not respond to medical treatment (Davidson, 1997; Hausmann et al., 2016). None of our cases presented with direct glaucoma signs, but preventive anti-hypertensive topical eye drops were used in cases where clinical symptoms, such as cataract and hyphema may have caused glaucoma, and no secondary glaucoma developed in any of the patients.

The clinical signs of head trauma include external evidence of bleeding and bruising, an alteration in mental status, development of ataxia or a degree of paresis, head tilt, nystagmus, tremors or other involuntary movements, and seizure activity (Clippinger et al., 2007; Jolly, 2015). In our study, in most cases, the attitude changes were recorded as nystagmus and head tilt. Additionally, auricular hemorrhage, circling, paresis, and ocular lesions were diagnosed as clinical signs of head trauma. Attitude changes resulting in nystagmus, head tilt, leaning, falling, rolling, or circling are common in head trauma patients and can result from central (cerebellum, brainstem or spinal cord) or peripheral (inner ear, vestibulocochlear nerve) dysfunction (Clippinger et al., 2007). An important part of the examination of traumatic brain injury in the more pork is a thorough ocular examination, examining both internal and external structures of the eye (Jolly, 2015). The ophthalmic examination helps identify problems in optic (CN II), oculomotor (CN III), trochlear (CN IV), abducens (CN VI), and trigeminal (CN V) nerves (Clippinger et al., 2007).

Ocular examination and neurologic assessment play an important role in avian clinical practice. We recommend that these two conditions are evaluated together in both trauma cases and eye diseases. The results of this study can serve as an indicator of occurrence and types of traumatic eye injuries in cage birds and free-living birds, and thus guide future studies.

## References

- Bayon A, Almela RM, Talavera J. Avian ophthalmology. Eur J Companion Anim Pract 2007;17(3):1-13.
- Clippinger TL, Bennett RA, Platt SR. The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques: A review update. Vet Clin North Am Exot Anim 2007; 10(3): 803-36.
- Davidson M. Ocular consequences of trauma in raptors. In Semin Avian Exotic Pet Med 1997; 6:121-30.
- Hausmann JC, Mans C, Gosling A, Miller JL, Chamberlin T, Dunn JR, Miller PE, Sladky KK. Bilateral uveitis and hyphema in a Catalina Macaw (*Ara ararauna* × *Ara macao*) with multicentric lymphoma. J Avian Med Surg 2016; 30(2):172-8.
- Holt DW, Layne EA. Eye injuries in long-eared owls (*Asio ootus*): Prevalence and survival. J Raptor Res 2008; 42(4): 243-8.
- Hudecki J, Finegan E. Song bird collision injuries during migration season. J Wildlife Rehab 2018; 38 (2): 7-11.
- Hvenegaard AP, Safatle AVM, Guimaraes MB, Ferreira AJP, Barros PSM. Retrospective study of ocular disorders in Amazon parrots. Pesq Vet Bras 2009; 29(12):979-84.
- Jolly M. Treatment of traumatic brain injury in Morepork owls: A review of diagnostic and treatment options. Proc Assoc Avian Vet 2015; 23: 31-9.
- Moore BA, Teixeira LB, Sponsel WE, Dubielzig RR. The consequences of avian ocular trauma: Histopathological evidence and implications of acute and chronic disease. Vet Ophthalmol 2017; 20(6):496-504.
- Murphy CJ, Kern T, McKeever K, McKeever L, McCoy D. Ocular lesions in free-living raptors. J Am Vet Med Assoc 1982;181(11): 1302-4.
- Murray M, Pizzirani S, Tseng F. A technique for evisceration as an alternative to enucleation in birds of prey: 19 cases. J Avian Med Surg 2013; 27(2): 120-7.
- Seruca C, Molina-Lopez R, Pena T, Leiva M. Ocular consequences of blunt trauma in two species of nocturnal raptors (*Atheno noctua* and *Otus scops*). Vet Ophthalmol 2012; 15(4): 236-44.
- Williams D. Cataracts in corvids: Health and welfare implications of lens opacification in a colony of Western scrub-jays (*Aphelocoma californica*). Int J Avian Wildlife Biol 2017; 2: 00011.
- Williams DL, Villavincencio CMG, Wilson S. Chronic ocular lesions in tawny owls (*Strix aluco*) injured by road traffic. Vet Rec 2006; 159(5):148-53.
- Willis AM, Willie DA. Avian ophthalmology, part 2: Review of ophthalmic diseases. J Avian Med Surg 1999; 13(4): 245-51.





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

Araştırma Makalesi / Research Article  
18(1), 26-30, 2021  
DOI: 10.32707/ercivet.878012

### Türkiye'de Yetiştirilen Holştayn Melezi Sığırlarda BLAD ve FXID Hastalıklarının Araştırılması

Esmâ Gamze AKSEL<sup>1</sup>, Fadime DALDABAN<sup>1</sup>, Korhan ARSLAN<sup>1</sup>, Hasan Hüseyin KEÇELİ<sup>1</sup>,  
Bilal AKYÜZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

**Sorumlu yazar:** Esmâ Gamze AKSEL; E-posta: gamzeilgar@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0002-0040-8933

**Atıf yapmak için:** Aksel EG, Daldaban F, Arslan K, Akyüz B, Keçeli HH. Türkiye'de yetiştirilen Holştayn melezi sığırlarda BLAD ve FXID hastalıklarının araştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2021; 18(1): 26-30

**Özet:** Bu çalışmada Türkiye'deki Holştayn melezlerinde Sığır Lökosit Bağlanma Eksikliği (BLAD) ve Faktör XI Eksikliği (FXID) kalıtsal hastalıklarına sebep olan mutant allellerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 48 baş sığır incelenmiştir. Yapılan moleküler analizlerden sonra incelenen melezi sığırların birinin BLAD taşıyıcısı olduğu, FXID taşıyıcısı bireye rastlanılmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile bu kalıtsal hastalıkların görüldüğü saf Holştayn ırkı dışında da BLAD ve FXID'ne sebep olan mutant allellerin varlığı araştırılmıştır. Böylece saf Holştayn ırkının haricinde de BLAD'a sebep olan mutant allelin varlığı ilk kez gösterilmiştir. Çalışma sonunda özellikle ıslah ve çevirme melezlemelerinde baba hat olarak kullanılacak damızlıkların, önemli kalıtsal hastalıklardan ari olduklarının kontrol edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Eğer bu konuda gerekli özen gösterilmez ise daha önce ırka özgü olduğu bilinen kalıtsal hastalıklara (BLAD, FIXID vb.) sebep olan mutant allellerin diğer sığır ırklarına da yayılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** BLAD, FXID, Holştayn melezi, kalıtsal hastalık, sığır

#### Investigation of FXID and BLAD Diseases in Holstein Crossbred Cattles Reared in Turkey

**Summary:** This study aimed to investigate the presence of mutant alleles of Bovine Leukocyte Binding Deficiency (BLAD) and Factor XI Deficiency (FXID) hereditary diseases in Holstein crossbreeds reared in Turkey. Total of 48 cattle were examined in the study. After molecular analysis, it was observed that one of the crossbreed cattle examined was a BLAD carrier and no FXID carrier was found. With this study, the presence of mutant alleles that cause BLAD and FXID, except for the purebred Holstein in which these hereditary diseases are seen, was investigated. So, it was determined for the first time that the presence of mutant allele was also seen in crossbreed Holstein. At the end of the study, it was concluded that breeds to be used as sire lines in breeding and crossbreeding should be checked which they had free from important hereditary diseases. It is concluded that mutant alleles that cause hereditary diseases (BLAD, FIXID, etc.), which were previously known to be breed-specific, can spread to other cattle breeds if the necessary care is not taken.

**Key words:** BLAD, FXID, Holstein crossbreed, hereditary disease, cattle

#### Giriş

Suni tohumlama yöntemi başta süt sığırı yetiştiriciliği olmak üzere, hayvancılık sektörünün gelişiminde çeşitli verimlerde hızlı genetik ilerleme sağlayan ve isabetli seleksiyon yapılmasına izin veren önemli bir teknolojidir (Medeiros ve ark., 2002). Ancak suni tohumlama yöntemi, hayvan başına verimi artırırken genetik yakınlığı da arttırmaktadır (Thomsen ve ark., 2006). Özellikle süt işletmelerinde yapılan seleksiyon çalışmalarında yakın zamana kadar, damızlıklar sadece süt verim özellikleri dikkate alınarak seçilirken, döl verimi ve sağlıkla ilgili özellikleri dikkate alınmamıştır. Süt sığırı yetiştiriciliğinde yapılan bu tek yönlü genetik ıslah çalışmaları, damızlıklarda hastalıklara direncin azalması ve özellikle de kalıtsal hastalıklara sebep olan mutant allellerin kısa sürede dünya çapında sığır popülasyonları arasında yayılmasına neden olmuştur (Mukhopadhyaya ve ark., 2006; Cole ve ark., 2016).

Sığırlarda bilinen kalıtsal hastalıklara çoğunlukla otozomal resesif olarak kalıtılan alleller neden olur. Otozomal resesif allellerin karakteristik özelliği, sadece her iki allel kalıtıldığında fenotip olarak ifade edilmelelidir. Dolayısıyla otozomal resesif kalıtılan alleller, bireyin heterozigot olduğu durumlarda fenotipte tespit edilememesinden dolayı popülasyon içinde yayılmaktadırlar. Bu sebeple sığır yetiştiriciliğinde otozomal resesif kalıtsal hastalıklar, otozomal dominant, X'e bağlı dominant veya X'e bağlı resesif olarak aktarılan ve pedigrî analizi ile kalıtım tipi daha kolay anlaşılan kalıtsal bozukluklara kıyasla geniş popülasyonlar için daha büyük bir endişe kaynağıdır (Agerholm, 2007).

Sığır Lökosit Bağlanma Eksikliği (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency, BLAD) ve Faktör XI Eksikliği (FXID) Holştayn ırkında bilinen en önemli iki kalıtsal hastalıktır. Homozigot olduğu durumda yavrunun ölümüyle sonuçlanan otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olan BLAD, nötrofillerin yüzey reseptörü olan ve glikoprotein tabiatlı  $\beta$ -integrini kodlayan gende meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşur. CD11/

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.10.2020  
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.11.2020



CD18 protein kompleksi ailesine ait bir glikoprotein olan  $\beta$ -integrinler, nötrofillerin damar dışına çıkarak inflamasyon bölgesine göçüne yardımcı olurlar (Nagahata ve ark., 1997). Hasta hayvanlarda,  $\beta$ -integrin glikoproteini kodlayan genin 383. pozisyonunda bulunan Adenin nükleotidinin, Guanin nükleotidi ile yer değişmesine neden olarak, ilgili proteinin 128. amino asidi olan aspartik asidi, glisine dönüştüren (D128G) bir nokta mutasyonu belirlenmiştir. Meydana gelen bu mutasyon ise CD11/CD18 kompleks oluşumunu bozarak, nötrofillerin damar dışına çıkmasının engellemektedir (Kehrl ve ark., 1990; Nagahata, 2004). Saf Holştayn ırkı sığırlarda bildirilmiş olan BLAD, homozigot buzağılarda doğumdan sonra ortaya çıkan kronik pnömoni ve kronik ishal nedeniyle ölüme neden olmaktadır (Ackermann ve ark., 1993; Nagahata, 2004). Hasta buzağılarda sık tekrarlayan mukozal enfeksiyonların yanı sıra, yara iyileşmesinde gecikme, kaşeksi ve büyüme geriliği, kalıcı ve belirgin nötrofil, diş eti iltihabı ve diş kaybı, yüksek ateş ve diğer yumuşak doku enfeksiyonları gibi bir dizi ciddi semptom görülmektedir (Kehrl ve ark., 1990; Shuster ve ark., 1992). Homozigot BLAD'lı buzağılar çoğunlukla bir yaşından önce ölürken, hayatta kalanlarda ise büyüme geriliği ve fertilitate bozuklukları görüldüğü bildirilmiştir (Agerholm, 2007). Hastalığa sebep olan mutant allelin Türkiye'deki Holştayn popülasyonundaki varlığı ilk kez 2004 yılında bildirilmiştir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006).

İlk olarak Amerikan Holştaynlarında 1969 yılında tanımlanan faktör XI yetmezliği (Factor XI Deficiency, FXID), sığırlarda 27. kromozomu üzerinde bulunan FXI geninin 12. ekzonuna adenince zengin 76 baz çifti uzunluğunda bir parçanın eklenmesi sonucu oluşan otozomal resesif bir kanama bozukluğudur (Liptrap ve ark., 1995). Meydana gelen mutasyon, gende erken bir "Dur" kodonunun oluşmasına sebep olarak, kan pıhtılaşmasında rol oynayan proteinlerden biri olan ve serin proteaz olarak da adlandırılan FXI proteininin oluşumunu engeller (Marron ve ark., 2004; Ghanem ve ark., 2005). Aşırı kanama ve üreme problemlerine de sebep olan FXID'de, hasta hayvanlar mastit, metrit, pnömoniye karşı yüksek duyarlılığa sahiptirler (Korkmaz Ağaoğlu ve ark., 2015). Hastalığa özgü semptomlar enjeksiyondan sonra uzayan kanama süresi, kanlı süt ve anemi olarak bildirilmiştir (Citek ve ark., 2006; Marron ve ark., 2004). Bu semptomlara ek olarak, buzağılar normalden daha düşük doğum ağırlığı ve

düşük hayatta kalma oranı gösterir. Hasta buzağıların bulaşıcı hastalıklara yakalanma olasılığı normal buzağılardan daha yüksektir (Marron ve ark., 2004). Bunlara ek olarak heterozigot damızlıklarda döl tutma problemlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Akyüz ve ark., 2012).

Planlanan bu çalışmada ise Türkiye'de değişik amaçlar ile yetiştirilen Holştayn melezlerinde BLAD ve FXID kalıtsal hastalıklarına sebep olan mutant allellerin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzim kesimi ile elde edilen parçacık polimorfizmi (RFLP) yöntemleri ile araştırılması hedeflenmiştir.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmanın hayvan materyalini Türkiye'de yetiştirilen farklı sığır ırklarının Holştayn melezleri oluşturmuştur. Çalışmada 26'sı Holştayn x Yerli Kara melezi, 15'i Holştayn x Doğu Anadolu Kırmızısı melezi, biri Holştayn x Güney Anadolu Kırmızısı melezi, biri Holştayn x Simental melezi, beşi Holştayn x Montofon melezi olmak üzere toplam 48 baş sığır incelenmiştir. İncelenen örneklerin hangi ırk melezi oldukları, geldikleri yerler ve fenotipik görünümüne göre karar verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan DNA'lar, ERÜ-HAYDEK 09.04.2014 tarih ve 14/77 karar nolu Etik Kurul izni ile daha önce toplanmış olan kanlardan elde edilmiştir. Çalışmanın DNA materyali total kandan fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) yöntemi ile izole edilmiştir. İncelenen örneklerde mutant BLAD allelinin varlığı Shuster ve ark. (1992) tarafından önerilen PCR-RFLP yöntemi ile; mutant FXID allelinin varlığı ise Marron ve ark. (2004) tarafından önerilen PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan PCR işlemlerinde kullanılan primerlere ait baz dizileri Tablo 1'de verilmiştir. PCR işlemi örnek başına 6.7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 2.5  $\mu$ l 10 X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon solüsyonu, 0.4  $\mu$ l dNTP (200  $\mu$ M) karışımı, 0.4  $\mu$ l 10 pmol ileri, 0.4  $\mu$ l 10 pmol ve geri primer, 1U Taq polimeraz (Thermo Scientific, USA) toplam karışım miktarı 20  $\mu$ l olacak şekilde olacak şekilde 50ng/ $\mu$ l DNA ilave edilerek hazırlanmıştır. PCR işlemi; 95 °C'de 5 dak ön denatürasyonu takiben, 95 °C'de 30 sn, bağlanma sıcaklığı BLAD için 55 °C'de, FXID için 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. BLAD için kesim reaksiyonu TaqI enzimi ile 65 °C'de 2 saat inkübasyon, 80 °C'de 20 dakika inaktivasyon şeklinde uygulanmıştır. Kesim ürünleri %3.5'lik nusieve agaroz jel ile 80V, 300mA'de 1 saat yürütülerek görüntülenmiştir. FXID genotiplenmesi için

**Tablo 1.** BLAD ve FXID genotiplenmesi için kullanılan primer dizileri

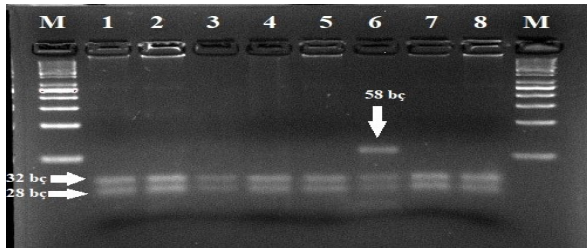
Hastalık	Primerler (5'-3')	Tm	bç	Gen Bankası Erişim No	RE
BLAD	F: TCCGGAGGGCCAAGGGCTA R:GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG	55	58	NC_037328.1	TaqI
FXID	F: CCCACTGGCTAGGAATCGT R: CAAGGCAATGTCATATCCA C	60	244	NC_037354.1	-

**Tm:** Primer bağlanma sıcaklığı; **bç:** Baz çifti; **RE:** Kesim enzimi

elde edilen PCR ürünleri de %2'lik agaroz jel elektroforezi ile 100V, 300mA'de 40 dakika süre ile yürütülerek görüntülenmiştir.

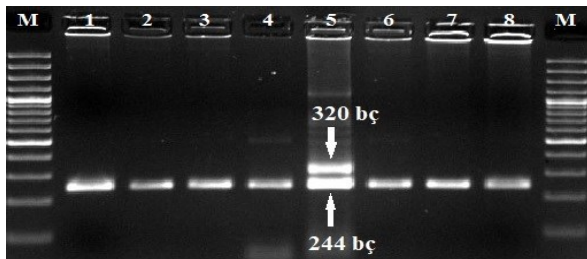
### Bulgular

Çalışmada taranan 48 baş Holştayn melezinden birinin (Holştayn x Doğu Anadolu Kırmızı melezi) BLAD taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1)



**Şekil 1.** M: 50 bç'lik DNA merdiveni; 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8: BLAD mutant alleli taşımayan normal genotipli (32, 26 bç) bireylerin enzim kesim görüntüsü; 6: BLAD mutant allelini taşıyan taşıyıcı genotipli (58, 32, 26 bç) bireyin enzim kesim görüntüsü

İncelenen melez sığırlarda FXID taşıyıcısına rastlanılmamıştır (Şekil 2).



**Şekil 2.** M: 100 bç'lik DNA merdiveni; 1, 2, 3, 4, 6, 7: FXID mutant allelini taşımayan normal genotipli bireyleri (244 bç'lik tek bant); 5: FXID taşıyıcı kontrolün PCR görüntüsü

### Tartışma ve Sonuç

Holştayn ırkı sığırlarda uzun süre uygulanan ıslah çalışmaları süt veriminde görülen artışa rağmen üreme performansında düşüşe, servis periyodunda uzamaya, sağlık sorunlarında ve ayıklama oranlarında artışa ve damızlıkta kalma sürelerinin kısılmasına sebep olmuştur (Turner, 2006; Blöttner ve ark., 2011). Belirlenen bu olumsuzlukların giderilmesi amacıyla melezlemeye ilgi artmıştır. (Yaylak ve ark., 2015). Ülkemizde olumsuz bakım ve besleme koşullarına ve hastalıklara dirençli fakat verim yönünden düşük yerli ırkların boğaları çevirme melezlemesi olarak Holştayn ırkı ineklerle çiftleştirilmektedir.

Özellikle Holştayn ırkı ineklerde görülen kalıtsal hastalıkların melezleme uygulanması halinde eğer genetik kontrol sağlanmaz ise (otozomal resesif kalıtsal hastalıklarda klinik semptom göstermedikleri için) taşıyıcıların mutant allelin bir sonraki kuşağa iletilme-

sindeki rolü büyüktür. Şayet taşıyıcılar, suni tohumlama ile yetiştirme programlarında yaygın olarak kullanılan boğalar ise durum daha da vahimleşmektedir (Ackerman, 1993). Bu nedenle kalıtsal hastalıklar yönünden arı popülasyonlar, ancak heterozigot bireylerin belirlenerek sürüden çıkarılmasıyla; heterozigot bireylerin çiftleştirilmesinin önlenmesiyle böylece hasta yavrunun doğumunun engellenmesi ile sağlanabilir (Ackerman, 1993). Bu amaçla da moleküler tanı testleri, taşıyıcıların tanımlanması, mutant alellerin sıklığının ve kalıtsal hastalıkların popülasyondaki insidansının azaltılması için önemli bir adımdır.

Süt sığırı yetiştiriciliğinde genetik değeri yüksek olan boğaların yetiştiricilikte yaygın kullanılmaları, resesif kalıtsal hastalıkların kısa sürede tüm dünyaya yayılmasına yol açmıştır. Bu hastalıklardan en önemlisi Holştaynlarda görülen BLAD hastalığıdır. Araştırmacılar, 2000 yılında BLAD hastalığı sıklığı için mutant allelin %24 olduğunu belirlenmişlerdir (Schütz ve ark., 2008). BLAD'a neden olan allel, c.383A>G'nin frekansının Litvanya süt sığırlarında; %0.0025 (Morkūniene ve ark., 2019), Çek sığırlarında; %0.82 (Citek ve ark., 2006), Çin Holştaynlarda; %0.69 (Sun ve ark., 2011), %1.37 (Zhang ve ark., 2012), Hint Holştayn Fresian ırkı sığırlarında; %3.23 (Patel ve ark., 2007), %1.69 (Roy ve ark., 2012), İran Holştaynlarda; %3.3 (Norouzy ve ark., 2005), %6.6 (Hemati ve ark., 2015), Amerikan Holştaynlarda; %14.1 (Shuster ve ark., 1992), Polonya Holştayn Fresian ırkı sığırlarda; %7.9 (Czarnik ve ark., 2007), Japonya'da; %13.4 (Nagahata ve ark., 1997) olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de ise yerli ırklarda BLAD alleleline rastlanmazken, Holştayn ırkı ineklerde %0.0084 (Akyüz ve Ertuğrul, 2006), %2.8 (Şahin ve ark., 2013), %2 (Korkmaz Ağaoğlu ve ark., 2015), %1.33 (Hacıhasanoğlu Çakmak ve Yardibi, 2019) olduğu bildirilmiştir.

FXID kalıtsal hastalığına ait allel frekansı verilerine göre ise; ABD'de bildirilen frekansın %1.19 (Marron ve ark., 2004), Japonya'da %2.5 (Ghanem ve ark., 2005), Çek Cumhuriyeti'nde %0.36 (Citek ve ark., 2008) olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de çeşitli bölgelerde FXID taşıyıcı frekans çalışmaları yapılmıştır. Bursa bölgesinde (Öner ve ark., 2010) %1.17 oranında taşıyıcı sıklığı, Burdur bölgesinde %1.8 (Korkmaz Ağaoğlu ve ark., 2015) ve Trakya bölgesinde bu çalışmada olduğu gibi FXID taşıyıcısı bulunmadığı (Avanus ve Altınel, 2016) bildirilmiştir.

Bu çalışma sonunda Türkiye'de yetiştirilen Holştayn x Yerli sığır melezlerinde BLAD'a sebep olan mutant allelin varlığı ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile daha önce yalnızca Holştayn ırkında görülen bu kalıtsal hastalığa sebep olan mutant allelin, kontrolünün sağlanmaması durumunda özellikle çevirme ve ıslah melezlemeleri ile yeni ırklara da taşınabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle çevirme ve ıslah melezlemelerinde kullanılan boğaların, BLAD ve FXID gibi bilinen hastalıkların oluşumunda rol oynayan ve önemli ekonomik kayıplara neden olan mutant allele-

ri taşıyıp taşımadıklarının kontrol edilmesi ve taşıyıcı boğaların damızlıkta kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca melez hayvanlarında yetiştiricilikte kullanıldığı işletmelerde, tohumlamada kullanılan spermaların da bu kalıtsal hastalıklar yönünden taranmasının gerekliliği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

### Kaynaklar

- Ackermann MR, Kehrlı ME, Morfitt DC. Ventral dermatitis and vasculitis in a calf with bovine leukocyte adhesion deficiency. *J AM Vet Med* 1993; 202(3): 413-5.
- Agerholm JS. Inherited disorders in Danish cattle. *Apmis Suppl* 2007; 115: 1-76.
- Akyüz B, Ertuğrul O. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle. *Acta Vet Hung* 2006; 54(2): 173-8.
- Akyuz B, Sariozkan S, Bayram D. Factor XI mutation in normally fertile and repeat breeding Holstein cows in the Middle Anatolian region of Turkey: A financial approach. *Anim Prod Sci* 2012; 52(11): 1042-5.
- Avanus K, Altinel A. Identification of allele frequency of factor XI deficiency (FXID) in Holstein cows reared in thrace region of Turkey. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2016; 42: 190-3.
- Blöttner S, Heins BJ, Wensch-Dorendorf M, Hansen LB, Swalve HH. A comparison between purebred Holstein and Brown Swiss × Holstein cows for milk production, somatic cell score, milking speed, and udder measurements in the first 3 lactations. *J Dairy Sci* 2011; 94: 5212-6.
- Citek J, Rehout V, Hajkova J, Pavkova J. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med-Czech* 2006; 51(6): 333-9.
- Cole J B, Null DJ, VanRaden PM. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *J Dairy Sci* 2016; 99(9): 7274-88.
- Czarnik U, Grzybowski G, Kamiński S, Prusak B, Zabolewicz T. Effectiveness of a program aimed at the elimination of BLAD-carrier bulls from Polish Holstein-Friesian cattle. *J Appl Genet* 2007; 48(4): 375-7.
- Ghanem ME, Nishibori M, Nakao T, Nakatani K, Akita M. Factor XI mutation in a Holstein cow with repeat breeding in Japan. *J Vet Med Sci* 2005; 67(7): 713-5.
- Hacihasanoglu Çakmak N, Yardibi H. Detection of allele and genotype frequencies of bovine leukocyte adhesion deficiency, factor XI deficiency and complex vertebral malformation disease genes in holstein cattle. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2019; 66(3): 311-5.
- Hemati B, Fazeli M H, Namvar Z, Ranji M. Investigation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and complex vertebral malformation (CVM) in a population of Iranian Holstein cows. *Iran J Appl Anim Sci* 2015; 5(1): 69-72.
- Kehrlı ME, Schmalstieg FC, Anderson DC, Van der Maaten MJ, Hughes BJ, Ackermann MR, Wilhelmssen CL, Brown GB, Stevens MG, Whetstone CA. Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am J Vet Res* 1990; 51(11): 1826-36.
- Korkmaz Ağaoğlu Ö, Ağaoğlu AR, Saatci M. Estimating allele frequencies of some hereditary diseases in Holstein cattle reared in Burdur Province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2015; 39(3): 338-42.
- Liptrap RM, Gentry PA, Ross ML, Cummings E. Preliminary findings of altered follicular activity in Holstein cows with coagulation factor XI deficiency. *Vet Res Commun* 1995; 19(6): 463-71.
- Marron BM, Robinson JL, Gentry PA, Beever JE. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Anim Genet* 2004; 35(6): 454-6.
- Medeiros CMO, Forrel F, Oliveria ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Spill Sci Technol B* 2002; 57: 327-44.
- Morkūnienė K, Bižienė R, Pečiulaitienė N, Ugenskienė R. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, and complex vertebral malformation in holstein cattle. *Slov Vet Res* 2019; 56(2): 75-82.
- Mukhopadhyaya PN, Jha M, Muraleedharan P, Gupta RR, Rathod RN, Mehta HH, Khoda VK. Simulation of normal, carrier and affected controls for large-scale genotyping of cattle for factor XI deficiency. *Genet Mol Res* 2006; 5(2): 323-32.
- Nagahata H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): A review. *J Vet Med Sci* 2004; 66(12): 1475-82.
- Nagahata H, Miura T, Tagaki K, Ohtake M, Noda H, Yasuda T, Nioka K. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 1997; 59(4): 233-8.
- Norouzy A, Nassiry M R, Eftekhari Shahrody F, Javadmanesh A, Mohammad Abadi M R, Sulimova G E. Identification of bovine leukocyte adhesion defi-

- ciency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. *Russ J Genet* 2005; 41(12): 1409-13.
- Öner Y, Keskin A, Elmaci C. Identification of BLAD, DUMPS, citrullinamia and factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. *Asian J Anim Vet Adv* 2010; 5: 60-5.
- Patel RK, Singh KM, Soni KJ, Chauhan JB, Sambasi-va Rao KRS. Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian cattle and buffalo breeds. *J Appl Genet* 2007; 48(2): 153-5.
- Roy A, Kotikalapudi R, Patel R K, Anantaneni R, Katragadda S. New cases of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian Holstein cattle. *Inter J Vet Sci* 2012; 1(2): 80-2.
- Şahin E, Karsli T, Galiç A, Balçioğlu MS. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and bovine citrullinaemia (BC) alleles in Holstein cows reared in Antalya region. *J Appl Anim Res* 2013; 41(1): 56-60.
- Schütz E, Scharfenstein M, Brenig B. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the holstein population. *J Dairy Sci* 2008; 91(12): 4854-9.
- Shuster DE, Kehrlie ME, Ackermann MR, Gilbert RO. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89(19): 9225-9.
- Sun DX, Fan XH, Xie Y, Chu Q, Sun Y, Zhang Y, Zhang SL, Gong WJ, Chen SH, Li YH, Shi WH, Zhang Y. Short communication: Distribution of recessive genetic defect carriers in Chinese Holstein. *J Dairy Sci* 2011; 94(11): 5695-8.
- Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res* 2006; 16(1): 97-105.
- Turner L. Crossbreeding in Dairy Herds. [http://www.dairyinfo.biz/images/Content/M5/132\\_Crossbreeding.pdf](http://www.dairyinfo.biz/images/Content/M5/132_Crossbreeding.pdf); Erişim tarihi: 16.10.2020.
- Yaylak E, Akbaş Y, Özsoy A. Siyah Alaca ile bazı süt sığır ırkları arasında yapılan melezlemeler ve melez ineklerin performansları. *Ziraat Fakültesi Dergisi* 2015; 10(1): 97-106.
- Zhang Y, Fan X, Sun D, Wang Y, Yu Y, Xie Y, Zhang S, Zhang Y. A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *J Anim Sci Biotechnol* 2012; 3: 24.





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

Araştırma Makalesi / Research Article  
18(1), 31-40, 2021  
DOI: 10.32707/ercivet.878020

### Veteriner Fitoterapi ve Etnoveteriner Hekimlikte de Kullanılan *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L. Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi

Mustafa YİPEL<sup>1</sup>, Sara Büşra EMİROĞLU<sup>1</sup>, Musa TÜRKMEN<sup>2</sup>, Erdiñ TÜRK<sup>1</sup>, Aysun İLHAN<sup>1</sup>,  
Fatma Ceren KIRGIZ<sup>1</sup>, İbrahim Ozan TEKELİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Hatay-TÜRKİYE  
<sup>2</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tıbbi Aromatik Bitkiler Anabilim Dalı, Hatay-TÜRKİYE

**Sorumlu yazar:** Sara Büşra EMİROĞLU; E-posta: sarabusraemiroglu@gmail.com; ORCID: 0000-0003-0855-4967

**Atıf yapmak için:** Yipel M, Emiroğlu SB, Türkmen M, Türk E, Kırız FC, Tekeli İO. Veteriner fitoterapi ve etnoveteriner hekimlikte de kullanılan *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L. bitkilerinin kimyasal içeriklerinin belirlenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2021; 18(1): 31-40

**Özet:** Bitki ve bitkisel materyaller veteriner fitoterapi ve etnoveteriner hekimlik uygulamaları içerisinde önemli bir yere sahiptir. Bitkiler tarafından sentezlenen bazı biyoaktif kimyasal bileşenler medikal etkilere sahiptir. Ancak bu bitki ve bitkisel materyallerin kullanımları; teşhisteki yanlışlıklar, doz ayarlama güçlüğü, geleneksel kullanımlarına dair yazılı kayıt ve bilimsel çalışmaların yetersizliği, düşük hijyen koşulları ve toplandığı bölgeye, mevsime, kullanılan kısmına ve elde edildiği yöntemlere göre sahip oldukları kimyasal kompozisyonlarının değişmesi gibi nedenlere bağlı olarak zehirlenmeler meydana getirebilmektedir. Çalışma kapsamında Hatay bölgesinde yetişen, veteriner fitoterapi ve etnoveteriner hekimliğinde de kullanılan *Thymbra spicata* var. *spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L. bitkilerinin içerdikleri biyoaktif kimyasal maddelerin kompozisyonları belirlenmiştir. Solvent ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen bitki ekstraksiyonlarının kimyasal kompozisyonları gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS) ile belirlendi. Analiz sonucunda *R. officinalis* L. ve *L. nobilis* L.'in ana bileşenleri sırasıyla %38.91 ve %33.70 oranlarında 1,8-sineol (ökaliptol) olarak tespit edildi. *T. spicata* var. *spicata* L.'nin ana bileşeni ise karvakrol (%48.82) olarak belirlendi. Bu bileşenlerin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri yanında karaciğer, böbrek, pankreas ve testis gibi organ hasarları, DNA iplik kopmaları ve solunum problemleri gibi istenmeyen ve zehirli etkilere de yol açtığı bildirilmiştir. Bu nedenle hayvan sağlığında da kullanılan tıbbi bitki ve bitkisel materyallerin ana bileşen ve oranının bilinmesinin potansiyel toksik etkilerin önlenmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Biyoaktif bileşenler, etnoveteriner hekimlik, solvent ekstraksiyon, toksikoloji, veteriner fitoterapi

#### Determination of Chemical Contents of *Thymbra spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Laurus nobilis* L., Also Used in Veterinary Phytotherapy and Ethnoveterinary Medicine

**Summary:** Plants and herbal substances have an important place in veterinary phytotherapy and ethnoveterinary medicine applications. Some bioactive chemical compounds synthesized by plants have medical effects. However, the use of these plants and herbal materials can cause poisoning due to wrong identification, difficulty in adjusting its dosage, insufficiency of written records and scientific studies on their traditional use, poor hygienic conditions in preparation and variation in their chemical composition according to the region, where and the season when they are gathered, their used part, and their extraction method. In our study, it was aimed to determine the chemical compositions and to toxicologically evaluate the major compounds of *T. spicata* var. *spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L., and *Laurus nobilis* L. grown in Hatay region and used in veterinary phytotherapy and ethnoveterinary medicine. Chemical compositions of plants contents obtained by solvent extraction method were determined by gas chromatography mass spectrophotometry (GC-MS) analysis. The major components of *R. officinalis* L. and *L. nobilis* L. were determined as 1,8-cineol (eucalyptol), in rates of 38.91%, and 33.70% respectively. The major component of *T. spicata* var. *spicata* L. was determined as carvacrol (48.82%). While these components have antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects, it has also been reported to cause undesirable and toxic effects such as organs damages (liver, kidney, pancreas and testes etc.), DNA thread breaks and respiratory problems. For this reason, it is thought that knowing the major components and their ratios of medicinal plants and materials used in animal health is important in terms of preventing potential toxic effects.

**Key words:** Bioactive components, ethnoveterinary medicine, solvent extraction, toxicology, veterinary phytotherapy

#### Giriş

Veteriner fitoterapi (VFT); hayvan hastalıklarının profilaksi ve tedavisinde bitki ve bitkisel materyallerin

(fitofarmasötiklerin) kullanımı olarak tanımlanmaktadır (Altınok Yipel ve Yipel, 2014; Yipel ve ark., 2018). Fitofarmasötiklerin de içerisinde yer aldığı; hayvanlarda verim ve refahın artırılmasıyla hastalıklardan korunma ve tedavide başvurulan bölgesel farklılıklara sahip geleneksel uygulamalar (bitkisel, hayvansal,

Geliş Tarihi/Submission Date : 27.07.2020  
Kabul Tarihi/Accepted Date : 23.11.2020

manevi, manipülatif, cerrahi vb.) ise etnoveteriner hekimlik (EVH) olarak tanımlanmaktadır. 1980'li yıllarda EVH'likle ilgili belgelerin ortaya çıkmasıyla asırlardır deneme yanılma yoluyla nesiller arası aktarılmış holistik ve interdisipliner uygulamalara dayalı bilgiler bilimsel bir zeminde incelenmeye başlanmıştır. Günümüzde ise hayvan sağlığı alanında hem hayvan sahipleri hem de veteriner hekimler tarafından geleneksel, modern veya alternatif uygulamalar (EVH, VFT vb.) içerisinde bitki ve bitkisel ürünlerin kullanımını gün geçtikçe artmaktadır (Altınok Yipel ve Yipel, 2014).

Bitki ve bitkisel kaynaklardan elde edilen materyallerin insanlık tarihinin erken dönemlerinden bu yana insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Ancak 18. yüzyılda kimya biliminin gelişmesi ve devamında ise sentetik ve yarı sentetik maddelerin üretimindeki artış bitkisel maddelerin kullanımında azalmaya neden olmuştur. Modern ilaçların yan etkilerinin belirlenmesiyle doğal kaynaklardan elde edilen maddelerin kullanımı zamanla artmaya başlamıştır (Karaoğlu ve Özgen, 2011). Bu nedenle günümüzde bitki ve bitkisel maddelerin kullanımı oldukça yaygındır.

Tıbbi bitkiler tarafından sentezlenen biyoaktif kimyasal bileşenler medikal etkilere sahiptirler. Güncel veriler dünya genelinde insanların %80'inin, Afrika da ise %95'inin bitkisel tedavi yöntemlerine başvurduklarını göstermektedir. Ayrıca, son 35 yılda geliştirilen ilaçların %70'inden fazlası doğal kaynaklara dayanmakta ve reçeteli ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kaynaklıdır (Güzel ve ark., 2015).

Etnoveteriner hekimlik kapsamındaki uygulamalar; düşük maliyetli, kolay ulaşılabilir, çevre dostu, doğal kaynaklardan elde edilen maddelerin kullanılması gibi birçok avantaj yanında kullanımları açısından bitki teşhisindeki yanlışlık riski, dozlama güçlüğü, yazılı kayıtların sınırlı olması, bilimsel çalışmaların yetersizliği ve hijyen standartlarının düşük olması gibi dezavantajlara da sahiptir (Altınok Yipel ve Yipel, 2014). Ayrıca EVH'de kullanılan bitkilerle ilgili yapılan bilimsel çalışmaların çoğu kimyasal içerikleri, sahip oldukları klinik ve terapötik etkileriyle ilgiliyken, toksikolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle özellikle hekim kontrolü dışında kullanımlar sonucunda bitkisel ürünlerle ilgili ölümle sonuçlanabilen yan etkiler bildirilmiştir. Bu yan etkiler, doğrudan toksisite, kontaminasyon, ilaçlar veya diğer bitkilerle etkileşimler dahil olmak üzere birkaç farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir (Peixoto ve ark., 2010). İnsanlar arasında kozmetik ve tıbbi açıdan bitki ve bitkisel madde kullanımının tamamıyla zararsız olduğuyla ilgili yanlış olan düşünce oldukça yaygındır. Unutulmamalıdır ki doz ilaçla zehir arasındaki sınırı belirleyen öncelikli parametredir. Tıbbi bitkilerin etki ve toksisitelerini değerlendirmek için bileşenlerinin doza bağlı biyolojik aktivitelerinin bilimsel çalışmalarla

belirlenmesi gerekmektedir (Peixoto ve ark., 2010).

Türkiye, 174 aile ve 125000 türe ait 12000'den fazla tür ve alt türden oluşan bir taksonla zengin bir bitki florasına sahiptir. Tüm Avrupa'da toplam endemik bitki sayısı 2750 iken, tür oranı ve çeşitliliği açısından Ortadoğu'nun en zengin florasına sahip Türkiye'de bu sayı 2891'dir. Türkiye'nin Akdeniz (Güney) bölgesi, 497 endemik alt tür ve 390 çeşitle diğer bölgelere göre en geniş endemik bitki çeşitliliğine sahip bölgedir (Kendir ve Güvenç, 2010).

*Thymbra spicata* var. *spicata* L., Türkiye'nin birçok bölgesinde (Güneydoğu Anadolu, Trakya, Ege ve Akdeniz) yetişen, çalı görünümülü, yaklaşık 50 cm yüksekliğinde yaprak dökmeven *Labiatae* ailesinin bir türüdür. Yaprakları taze ya da kurutulmuş olarak kullanılabilen bitki, sahip olduğu aromatik ve tıbbi özellikleri nedeniyle gün geçtikçe artan bir ekonomik değere sahiptir (Lee ve ark., 2005; Mert ve ark., 2016). Bölgesel olarak kekik, kaya kekigi, zahter olarak da adlandırılan *T. spicata* var. *spicata* L. etnotipta genellikle antiseptik, ekspektoran, kramp çözücü ve antimikrobiyal etkileri için kullanılmaktadır. Hayvan sağlığı alanında kullanımıyla ilgili sınırlı bilgi bulunan *T. spicata* var. *spicata* L.'nin biyokimyasal kompozisyon açısından ülkemizde de yetişen diğer kekik (*Thymus* spp. ve *Oreganum* spp.) türleriyle benzerlik gösterdiği ve bu türlerinde yüksek oranda karvakraol içerdiği rapor edilmiştir (Azcan ve ark., 2000; Tohid ve ark., 2017). *Thymbra spicata* var. *spicata* L. ve diğer kekik türlerinin EVH ve VFT'de yaprak ve kök kısımları, enteral ya da lokal formülasyonlar şeklinde gastrointestinal sistem ve dermal hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Benli ve Yiğit, 2005; Wynn ve Fougere, 2006; Yipel ve ark., 2017).

*R. officinalis* L., *Labiatae* ailesinden dik saplı, beyazımsı mavi çiçek ve koyu yeşil yapraklara sahip, yaklaşık bir metre yüksekliğe ulaşabilen, yaprak dökmeven çalı formu bir türdür. Akdeniz'in kuzey ve güney kıyılarıyla Himalaya'nın alt bölgelerinde yabani olarak yetişmektedir (Al-Sereiti ve ark., 1999). Türkçe olarak biberiye, haslban ve kuşdili gibi isimlerle bilinmektedir (Özcan ve Chalchat, 2008). *R. officinalis* L. bitkisinin antiseptik, antiparazitik, antidiyabetik, diüretik, antispazmodik, antiromatizmal ve mide yaralarının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Al-Sereiti ve ark., 1999; Lahlou ve Berrada 2003; Özcan ve Chalchat, 2008). Biberiyenin farmakolojik ve terapötik özelliklerinin araştırıldığı bir yayında *R. officinalis* L. bitkisinin esansiyel yağının antihepatotoksik, antimikotik, anti-tümorojenik etkilerinin olduğu bir çok çalışmadan bahsedilmiştir (Al-Sereiti ve ark., 1999). Ayrıca EVH ve VFT'de yaprak ve çiçekleri enteral ya da lokal olarak gastrointestinal sistem, üreme ve dermal hastalıkların tedavisinde antienflamatuar, sedatif, antibakteriyel ve antifungal olarak kullanılmaktadır. Atlarda anti-enflamatuar olarak da kullanıldığı bildirilmiştir (Wynn ve Fougere, 2006; Yipel ve ark., 2017).

*L. nobilis* L. (defne) Türkiye, Cezayir, Yunanistan gibi Akdeniz ülkeleri yanında Avrupa (Belçika, Fransa), Asya ve Güney Amerika (Meksika) da doğal olarak yetişmektedir. Akdeniz defnesi bazen bodur bazen de boylu ağaççık formundadır. Halk arasında har, teynel ve gar olarak da adlandırılan defne, sabun yapımında sık kullanılmaktadır. *L. nobilis* L. etnotipta yaprakları uykusuzluk giderici ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda analjezik ve antiseptik, mide rahatsızlıklarını giderici, antidiyabetik, halsizlik giderici, hazımsızlık ve migren önleyici gibi özellikleri de bildirilmiştir (Karık ve ark., 2015). *Laurus nobilis* L. Akdeniz'de yetişen, anavatanı Balkanlar ve Anadolu olan, 15 m kadar değişen boylara sahip yuvarlak tepeli, sık dallı dört mevsim yeşil ağaçlardır. Yapraklar farklı şekillerde, 11 cm boyunda, 2-4 cm genişliğindedir. Gövde kabuğu, düzgün, çatlaksız, koyu gri renklidir. Türkiye'de Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz kıyılarında doğal olarak yetişmektedir (Akkemik, 2018). Dekoratif park bitkisi olması yanında aynı zamanda odun dışı orman ürünü olarak kullanımı önemlidir. Yaprak ve meyve yağı eczacılıkta ve sabun endüstrisinde, yapraklarının kurutulmuş hali ise baharat olarak kullanılmaktadır (Akkemik, 2018). *L. nobilis* L. VFT'de atlarda enteral ya da lokal formülasyonlar şeklinde iştah uyarıcı ve dermal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Wynn ve Fougere, 2006; Yipel ve ark., 2017).

Tıbbi ve aromatik özelliğe sahip bitkiler, insanlık tarihinin ilk dönemlerinden beri insan ve hayvanlar için vazgeçilmez olmuştur. İnsan ve hayvan hastalıklarında yaygın olarak kullanılan bitkilerin terapötik etkileri hem uzun yıllar deneme yanılma yoluyla hem de bilimsel araştırmalar doğrultusunda tespit edilmiştir. Bitkilerin insan ve hayvan sağlığında hekim kontrolü dışında kullanımı, yanlış teşhisi, eksik veya yanlış hazırlanması, endikasyon dışı ya da yanlış miktarlarda kullanılmaları sonucunda toksikasyon gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda bitki ve bitkisel materyallerin toksikolojik özelliklerinin bilinmesi zorunlu hale gelerek, konuyla ilgili çalışmaların artması-na neden olmuştur (Peixoto ve ark., 2010).

Çalışmanın temel amacı yüzyıllardır insan ve hayvan sağlığında EVH'de kullanılan, günümüzde VFT'de kullanımı gün geçtikçe artan bitki ve ekstraktlarının

içerdiği biyoaktif kimyasal bileşenlerin aynı zamanda toksik etkilerinin de olabileceğini vurgulamaktır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada Hatay bölgesinde yetişen EVH ve VFT de kullanılan tıbbi bitkilerden 3'ünün (*T. spicata* var. *spicata* L., *R. officinalis* L. ve *L. nobilis* L.) kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada Hatay bölgesinde doğal olarak yetişen ve veteriner fitoterapi ile EVH'de de kullanılan tıbbi bitkilerden *T. spicata* var. *spicata* L. ve *R. officinalis* L. çiçeklenme, *L. nobilis* L. ise çiçeklenme sonrası (Şekil 1) dönemde Antakya florasından toplanarak teşhis edildi. Bitkiler oda sıcaklığında (20-28°C) kurutulduktan sonra yapraklar bitkinin diğer kısımlarından ayrıldı ve kurutulup öğütülerek ekstraksiyona hazır hale getirildi.

Çalışmada bitkilerde bulunan biyoaktif kimyasal bileşenlerin ekstraksiyonu için solvent olarak metanol (Merck® 1.06007.2500, Almanya) seçildi. Toplanan bitkiler öğütücüde (Lavion®, Çin) toz haline getirildi. Her bir bitkiden 50 g tartılarak bir cam şişe içerisine alındı ve üzerlerine 125'er ml metanol eklenerek manyetik karıştırıcıda (M TOPS® HS15-03P, Güney Kore) 24 saat boyunca ekstraksiyona bırakıldı. İşlem sonunda ekstraktlar, filtre kağıdıyla süzüldü (Al-Rubaye ve ark., 2017). Ekstraktlar ile analizi yapılmaya kadar +4 °C'de saklandı. Ekstraktların kimyasal kompozisyonları gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS) analiziyle belirlendi. Bu işlem GS-MS (Thermo Scientific ISQ Single Quadru-



**Şekil 1.** Çalışmada kimyasal kompozisyonları belirlenerek toksikolojik yönden incelenen ve Hatay bölgesinde yetişen *T. spicata* var. *spicata* L. (A), *R. officinalis* L. (B) ve *L. nobilis* L. (C) bitkilerinin sırasıyla verilen genel görünümüleri

**Tablo 1.** Gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS) analiz koşulları

Cihaz	Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole
Kolon	TR-FAME MS model, %5 Fenil Polisilfenilen-siloksan, 0.25 mm iç çap x 60 m uzunlukta, 0.25 µm
İyonizasyon 22 enerjisi	70 eV
Kütle aralığı m/z	1.2-1200 amu
MS transfer line sıcaklığı	250 °C
MS iyonizasyon sıcaklığı	220
Enjeksiyon port sıcaklığı	220 °C
Kolon sıcaklığı	50-220 °C (3 °C/dak)
Helyum (%99.9) akış hızı	1 mL /dak
Veri toplama modu	Scan Mode
Kütüphane	Xcalibur progamı (Wiley 9)



pole, USA) cihazıyla Tablo 1'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

### Bulgular

Yirmi dört saatlik metanol ekstraksiyonu sonucunda elde edilen bitki ekstraktlarının GC-MS analizi sonucunda *T. spicata* var. *spicata* L., bitkisinin bileşenleri incelendiğinde toplam 45 kimyasal bileşen madde belirlendi. Ana bileşenleri olarak karvakrol (%48.82) ve  $\gamma$ -terpinen (%33.79) tespit edildi (Tablo 2).

*Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstraksiyonun bileşenleri incelendiğinde ise 42 kimyasal bileşen belirlendi. Ana bileşenleri olarak 1,8-sineol

(ökaliptol) (%38.91) ve  $\alpha$ -pinen (%11.25) olarak tespit edildi (Tablo 3).

*Laurus nobilis* L. bitkisinde ise toplam 44 kimyasal bileşen belirlendi. Ana bileşenleri olarak 1,8-sineol (%33.70) ve  $\alpha$ -terpinil asetat (%22.28) tespit edildi (Tablo 4).

**Tablo 2.** *Thymbra spicata* var. *spicata* L. bitkisi kimyasal bileşenleri

Sıra	RT	Yüzde (%)	Bileşenler
1	8.41	0.21	$\beta$ -Pinen <sup>a</sup>
2	8.96	1.22	Mirsen <sup>a</sup>
3	9.41	0.21	$\alpha$ -Felandren <sup>a</sup>
4	11.12	33.79	$\gamma$ -Terpinen <sup>a</sup>
5	12.64	2.75	o-Simen <sup>a</sup>
6	19.62	0.17	cis-Sabinen hidrat <sup>a</sup>
7	6.50	1.18	$\alpha$ -Tujen <sup>b</sup>
8	22.87	0.18	trans Sabinen hidrat <sup>b</sup>
9	26.96	0.17	$\alpha$ -Terpineol <sup>b</sup>
10	27.50	0.13	Izoborneol <sup>c</sup>
11	38.75	0.42	Timol <sup>c</sup>
12	39.88	48.82	Karvakrol <sup>c</sup>
13	25.87	1.52	$\beta$ -Bisabolene <sup>d</sup>
14	49.85	0.56	Fitol <sup>e</sup>
15	17.06	0.06	1-Octen-3-ol <sup>f</sup>
16	9.82	2.52	$\alpha$ -Terpinen <sup>g</sup>
17	12.00	0.13	1-Terpinenol <sup>g</sup>
18	13.31	0.14	Etil metil eter <sup>g</sup>
19	17.82	0.04	$\beta$ -Hidroksietil akrilat <sup>g</sup>
20	20.64	0.08	cis-Limonen oksit <sup>g</sup>
21	23.46	0.06	9-exo-methyl-anti(9,10)-tricyclo[4.2.1.1(2.5)]dec-3-en-9-endo-ol <sup>g</sup>
22	24.17	0.99	trans-Karyofilen <sup>g</sup>
23	25.01	0.06	Ledene <sup>g</sup>
24	28.41	0.34	trans-p-Mentha-1(7).8-dien-2-ol <sup>g</sup>
25	32.60	0.15	Neophytadiene <sup>g</sup>
26	32.72	0.11	9-Eicosyne <sup>g</sup>
27	34.39	0.06	9-Octadecenoik asit (Z)-. Fenilmetil ester <sup>g</sup>
28	34.76	0.53	3-Metil-4-izopropil fenol <sup>g</sup>
29	35.41	0.07	2.5-Dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanone <sup>g</sup>
30	37.90	0.11	Timin <sup>g</sup>
31	38.44	0.10	Penol. 2-(1.1-dimetiletıl)- <sup>g</sup>
32	40.50	0.20	2- Metoksimesitilen <sup>g</sup>
33	41.30	0.06	Ascaridole epoksit <sup>g</sup>
34	41.87	0.54	1-Naphthalenol <sup>g</sup>
35	42.09	0.05	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptan. 1-metoksi-2.2.6-trimetil- <sup>g</sup>
36	42.41	0.08	Eicosahydrodibenzo(a.i)fluorene <sup>g</sup>
37	42.52	0.13	2-Metoksi-4-vinilfenol <sup>g</sup>
38	43.97	0.09	1- Vinil (ethenyl) sikloheksanol <sup>g</sup>
39	45.56	0.08	$\gamma$ -Butil- $\gamma$ -bütirolakton <sup>g</sup>
40	46.36	0.37	1-Penten-3-ol <sup>g</sup>
41	47.21	0.41	3-Furanol. tetrahidro- <sup>g</sup>
42	49.37	0.05	5-Asetildihidro-2(3H)-furanone <sup>g</sup>
43	50.44	0.05	Cholestan-3-ol. 2-metilen- <sup>g</sup>
44	52.72	0.26	Izopropil metil nitrozamin <sup>g</sup>
45	53.34	0.40	5-Hidroksimetilfurfural <sup>g</sup>

Bileşenlerin bulunduğu gruplar; a: Monoterpen hidrokarbon, b: Oksijenli monoterpen, c: Monoterpen, d: Hidrokarbon Siskiterpen, e: Diterpen, f: Hidrokarbon, g: Diğer.

yan kişiler tarafından tavsiye edilmesi ya da kullanılması sonucunda ciddi yan etkiler meydana gelebilmektedir (George, 2011). Bu durumda bitki ve bitkisel materyallerin toksikolojik özelliklerinin bilinmesini zorunlu hale getirerek, konuyla ilgili çalışmaların artmasına neden olmuştur (Peixoto ve ark., 2010).

**Tablo 3.** *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi kimyasal bileşenleri

Sıra	RT	Yüzde (%)	Bileşenler
1	6.59	11.25	$\alpha$ -Pinen <sup>a</sup>
2	7.61	2.24	Kampen <sup>a</sup>
3	8.44	0.20	Carene <sup>a</sup>
4	9.00	2.74	Mirsen <sup>a</sup>
5	10.05	2.51	Limonen <sup>a</sup>
6	11.18	0.10	$\gamma$ -Terpinen <sup>a</sup>
7	12.68	3.51	$p$ -Simen <sup>a</sup>
8	12.07	38.91	Ökaltirol (1,8-sineol) <sup>b</sup>
9	20.65	0.39	Linalool <sup>b</sup>
10	25.97	8.29	Kâfur <sup>b</sup>
11	26.96	4.80	$\alpha$ -Terpineol <sup>b</sup>
12	27.52	6.89	Borneol <sup>b</sup>
13	31.65	0.18	$p$ -Simen-8-ol <sup>b</sup>
14	23.31	0.10	Fenhol (Fenčil alcohol) <sup>c</sup>
15	33.51	0.64	Verbenone <sup>c</sup>
16	38.48	0.15	Timol <sup>c</sup>
17	39.77	0.14	Karvakrol <sup>d</sup>
18	24.19	5.80	trans-Karyofilen <sup>e</sup>
19	37.92	0.10	Metil Ögenol <sup>f</sup>
20	38.25	0.35	Karyofilen oksit <sup>g</sup>
21	39.53	0.16	Globulol <sup>h</sup>
22	40.74	0.16	Ögenol <sup>i</sup>
23	41.32	0.20	Retinal <sup>k</sup>
24	17.11	0.12	1-Octen-3-ol <sup>m</sup>
25	13.5	0.17	Asetik asit
26	25.32	1.92	Asetik asit. 1.7.7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester <sup>n</sup>
27	26.62	1.32	L- $\alpha$ -Terpineol <sup>n</sup>
28	40.6	0.09	Bornanediol <sup>n</sup>
29	41.99	0.22	2-Propil-tetrahidropiran-3-ol <sup>n</sup>
30	42.55	0.38	4-Hidroksi-2-metilasetofenon <sup>n</sup>
31	44.61	1.79	Aromadendren Epoksit -(I) <sup>n</sup>
32	46.34	0.32	Fenol. 2.6-dimethoksi- <sup>n</sup>
33	47.27	0.11	Allil glisidil eter <sup>n</sup>
34	47.81	0.08	ar-Abietatrien <sup>n</sup>
35	50.36	0.46	Metil jasmonat <sup>n</sup>
36	51.37	0.24	Talsutin <sup>n</sup>
37	52.75	0.10	Etilamin. N-etil-N-nitroso- <sup>n</sup>
38	53.16	0.20	3.4-Dimethoksi-5-iodo-2.2'-bipyridine <sup>n</sup>
39	54.1	0.39	Temazepam <sup>n</sup>
40	54.23	0.45	Fenol. (1.1-dimethil)4-methoksi- <sup>n</sup>
41	55.36	0.64	Podocarpa-1.8.11.13-tetraen-3-one. 14-isopropil-1.13-dimethoksi
42	56.09	0.39	Pregn-4-ene-3.20-dione. 6.16-dimetil- <sup>n</sup>

Bileşenlerin bulunduğu gruplar; a: Monoterpen hidrokarbon, b: Oksijenli monoterpen, c: Monoterpen, d: Monosiklik monoterpen, e: Siskiterpen, f: Hidrokarbon Siskiterpen, g: Oksijenli Siskiterpen, j: Oksijenli Fenilpropanoid, k: Diterpen, m: Hidrokarbon, n: Diğer.

### Tartışma ve Sonuç

Tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünler (ekstrakt, uçucu yağ vs.) eski çağlardan beri insan ve hayvan hastalıklarının korunması ve tedavisinde kullanılmaktadır (Yipel ve Yipel, 2014). Tıbbi bitkiler 400 veya daha fazla kimyasal bileşenleri içerebilir. Günümüzde hayvan hastalıklarında tıbbi bitki ve ürünlerinin uzman olma-

Adıyaman'ın Kahta ilçesinde yapılan bir çalışmada *T. spicata* var. *spicata* L. bitkisi üç farklı dönemde (çiçeklenmeden önce, çiçeklenme dönemi ve çiçeklenmeden sonra) toplanmış ve hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağları elde edilmiştir. Bu çalışmanın GC-MS analizi sonucunda 45'ten fazla bileşen belirlenmiştir. Karvakrol bileşeninin en yüksek oranı (% 64.53) çiçeklenme sonrası, en düşük oranı (%53.55)

**Tablo 4.** *Laurus nobilis* L. bitkisi kimyasal bileşenleri

Sıra	RT	Yüzde (%)	Bileşen
1	6.56	2.40	$\alpha$ -Pinen <sup>a</sup>
2	8.39	1.12	$\beta$ -Pinen <sup>a</sup>
3	8.69	6.04	Sabinen <sup>a</sup>
4	10.02	1.05	Limonen <sup>a</sup>
5	10.95	0.94	$\beta$ -Felandren <sup>a</sup>
6	12.63	2.28	<i>p</i> -Simen <sup>a</sup>
7	19.61	0.60	cis-Sabinen hidrat <sup>a</sup>
8	12.05	33.70	Ökalyptol (1,8-sineol) <sup>b</sup>
9	20.59	1.60	Linalool <sup>b</sup>
10	22.86	0.52	trans Sabinen hidrat <sup>b</sup>
11	24.15	2.41	Terpinen-4-ol <sup>b</sup>
12	25.31	0.40	Bornyl asetat <sup>b</sup>
13	26.59	0.52	$\alpha$ -Terpineol <sup>b</sup>
14	27.49	22.28	$\alpha$ -Terpinil asetat <sup>b</sup>
15	27.72	0.29	Linalil asetat <sup>b</sup>
16	29.50	0.35	Mirtenol <sup>b</sup>
17	45.64	0.51	Verbenol <sup>c</sup>
18	27.14	0.31	Alloaromadendren <sup>d</sup>
19	30.11	0.44	Limonen oksit <sup>e</sup>
20	38.73	1.56	Karyofilen Oksit <sup>e</sup>
21	40.39	0.88	Spathulenol <sup>e</sup>
22	43.31	0.69	Metil izoöjenol <sup>f</sup>
23	22.64	0.29	Elemen <sup>g</sup>
24	26.14	0.30	Pinocarvone <sup>g</sup>
25	26.92	2.80	L- $\alpha$ -Terpineol <sup>g</sup>
26	28.64	0.44	Myrtenal <sup>g</sup>
27	35.41	0.49	cis-3-Heksenil iso-butirat <sup>g</sup>
28	37.85	3.77	Metil ögenol <sup>g</sup>
29	39.74	0.90	Piperitenon oksit <sup>g</sup>
30	39.92	0.47	8-Hidroksi linalool <sup>g</sup>
31	40.50	0.37	d-Glukozamin <sup>g</sup>
32	40.66	1.49	3-Allil-6-metoksifenol <sup>g</sup>
33	41.13	1.18	cis-Verbenol <sup>g</sup>
34	41.87	0.31	1-Naphthalenol <sup>g</sup>
35	43.01	0.32	Guaiol <sup>g</sup>
36	43.63	1.37	Eudesmo <sup>g</sup>
37	46.20	0.45	Cinnamic asit. o-hidroksi- <sup>g</sup>
38	46.40	0.32	trans-Izoöjenol <sup>g</sup>
39	46.52	0.31	2-Metil-4-(2.6.6-trimetilsikloheks-2-enil)but-3-en-2-ol <sup>g</sup>
40	48.30	0.95	trans-p-Mentha-1(7).8-dien-2-ol <sup>g</sup>
41	49.03	0.39	cis-Asarone <sup>g</sup>
43	49.46	0.31	5-(1-Bromo-1-metiletil)-2-metilsikloheks-2-enon <sup>g</sup>
44	49.79	0.38	Nerolidol-epoksi asetat <sup>g</sup>

Bileşenlerin bulunduğu gruplar; a: Monoterpen hidrokarbon, b: Oksijenli monoterpen, c: Monoterpen, d: Hidrokarbon Siskiterpen, e: Oksijenli Seskiterpen, f: Oksijenli Fenilpropanoid, g: Diğer.

ise çiçeklenme döneminden önce saptanmıştır. Bununla birlikte,  $\gamma$ -terpinen oranı (%19.45'ten %14.29'a) bitkinin olgunlaşmasıyla azalmıştır (Inan ve ark., 2011). Saidi ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *T. spicata* var. *spicata* L. bitkisinden 46 farklı bileşen elde etmiştir ve ana bileşenler olarak karvakrol (% 60.36),  $\gamma$ -terpinen (%15.09),  $\beta$ -mirsen (%2.5), trans-karyofilen (%1.78),  $\alpha$ -tujen (%1.54) ve timol (%1.19) tanımlanmıştır. Bir diğer çalışmada karvakrol (% 78.53),  $\gamma$ -terpinen (%10.42) ve *p*-simen (%5,49) ana bileşenler olarak tespit edilmiş olup bu maddelerin yanında toplam 40 bileşen daha belirlenmiştir (Bayan ve ark., 2017). Bu çalışma sonucunda ana bileşen olarak karvakrol ve  $\gamma$ -terpinen belirlenmiş olup bu bileşenlerin diğer çalışmalarda da yüksek

oranda olduğu görülmüştür. Özellikle karvakrol maddesi *T. spicata* var. *spicata* L. bitkisinden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. *T. spicata* var. *spicata* L. bitkisinden yüksek miktarda elde edilen karvakrol genellikle tatlandırıcı olarak insan gıdalarında düşük oranda bulunmaktadır (Ündeğer ve ark., 2009). Karvakrol, gıda bozulmalarının ve gıda kaynaklı patojenik bakterilerin büyümesini kontrol etmede etkilidir (Suntres ve ark., 2015). Bakteri, mantar ve maya üzerindeki antimikrobiyal etkileri nedeniyle de yaygın olarak kullanılır. Ayrıca böcek öldürücü ve antioksidan özellikleri de vardır (Llana-Ruiz-Cabello ve ark., 2015). Karvakrol'un farelerde intravenöz veya intraperitoneal yolla uygulanması sonucunda ortalama ölümcül doz

(LD<sub>50</sub>) sırasıyla 80.00 ve 73.30 mg/kg olduğu (Hagan ve ark., 1967; Suntres ve ark., 2015), ratlarda oral yolla uygulandığında ise ortalama ölümcül dozun (LD<sub>50</sub>) 810 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Andersen, 2006; Suntres ve ark., 2015). İnsan lenfositleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise karvakrol'un 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonları DNA iplik kopmasına neden olmuştur (Aydın ve ark., 2005; Llana-Ruiz-Cabello ve ark., 2015).

*T. spicata* var. *spicata* L.'den elden edilen karvakrol ve timolün DNA ile etkileşimleri, tek iplikçik kopması, çift iplikçik kopmaları, baz hasarı ve diğerleri gibi çeşitli moleküler hasarlara neden olur. Yapılan bir çalışmanın sonucunda, karvakrol (70 mg/kg dozunda) ve timolün (40, 60, 80 ve 100 mg/kg dozlarında) sıçan kemik iliği hücrelerinde yapısal, sayısal ve toplam kromozom anormalliklerini indüklediği karvakrol ve timolün, mitotik indeksi azaltarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Azirak ve Rencuzogullari, 2008).

Bu sonuçlardan, karvakrol ve timolün büyük olasılıkla genotoksik bir risk taşıdığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle, yiyecek, içecek, farmakoloji, parfümeri, kozmetik ve ilaç endüstrisinde antihelmintik, antiseptik, antifungal, antibakteriyel ve antiviral maddeler olarak kullanırken dikkatli olmak gerekir (Azirak ve Rencuzogullari, 2008).

*T. spicata* var. *spicata* L. bitkisinden  $\gamma$ -terpinen bileşeni ikinci olarak yüksek oranda bulunmuştur. Karvakrol bileşeninde olduğu gibi bu madde de antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu sebeple patojenik mikroorganizmaların büyümesini geciktirmek veya inhibe etmek için kullanılabilirler. Gamma-terpinen toksikolojik olarak incelendiğinde, tek başına 0.2 mM'den başlayan konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde DNA hasarına neden olduğu görülmüştür (Aydın ve ark., 2005).

Konya'da yapılan bir çalışmada *R. officinalis* L. bitkisinin hidrodistilasyonu ve GC-MS analizi sonucunda 20 biyoaktif bileşen tanımlanmıştır. Ana bileşenler *p*-simen (%44.02), linalool (%20.5), terpinen (%16.62), timol (%1.81),  $\beta$ -pinen (%3.61),  $\alpha$ -pinen (%2.83) ve 1,8-sineol (ökaliptol) (%2.64) olarak belirlenmiştir (Özcan ve Chalchat, 2008). Sardunya ve Korsika bölgelerinden toplanan *R. officinalis* L. bitkisinin ana bileşenleri sırasıyla,  $\alpha$ -pinen (%13.7-24.6), bornil asetat (%11.3-17.0), verbenon (%4.4-24.9), kafur (%2.9-14.1) ve 1,8-sineol (ökaliptol) (%3.4-11.3) olarak bulunmuştur (Pintore ve ark., 2002). *R. officinalis* L. bileşenlerinden ökaliptol (1,8-sineol) (%8.7, %49.8 ve %40.0),  $\alpha$ -pinen (%34.0, %18.7 ve %23.5), kafur (%11.7, %12.6 ve %13.2) ve borneol (%16.9, %7.1 ve %4.6) Fas'ın Rabat, Errachidia ve Oujda şehirlerinde ana bileşenler olarak belirlenmiştir (Lahlou ve Berrada, 2003). Başka bir çalışmada *R. officinalis* L. bitkisinden kafur (%18.9), verbenon (%11.3),  $\alpha$ -pinen

(%9.6),  $\beta$ -mirsen (%8.6), 1,8-sineol (ökaliptol) (%8.0) ve  $\beta$ -karyofilen (%5.1) bileşenleri tespit edilmiştir (Bernardes ve ark., 2010).

Mevcut çalışma sonucunda, *R. officinalis* L. bitkisinden elde edilen bileşenlerin oranları diğer çalışmalarda elde edilen bileşenlerin oranlarından farklı bulunmuştur. Bir çalışmada yazarlar bu farkın sebebini, farklı çevresel ve genetik faktörler, farklı kemotipler, bitkilerin beslenme durumu ve ayrıca yağ kompozisyonunu etkileyebilecek diğer faktörlerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Özcan ve Chalchat, 2008). Hayvan sağlığı alanında birçok endikasyon için kullanılan *R. officinalis* L. bitkisi P-450 grubu bazı biyotransformasyon enzim (CYP1A, CYP2E, CYP3A) ve P-glikoprotein substratlarıyla diüretikler, insülin ve oral hipoglisemikler, siklofosamid ve demirle istenmeyen etkileşim potansiyeline sahiptir. Ayrıca uterus kasılması nedeniyle aborta neden olabileceğinden gebe hayvanlarda kullanımı kontrendikedir (Wynn ve Fougere, 2006).

*Laurus nobilis* L. bitkisi için Kuzey Kıbrıs'da yapılan bir çalışmada 81 farklı bileşen tanımlanmıştır. Bu çalışmada bitkinin yapraklarından hidrodistilasyon yöntemi kullanarak yüksek oranda 1,8-sineol (ökaliptol) (%58.59) belirlenmiştir. Elde edilen diğer ana bileşenler, sırasıyla  $\alpha$ -terpinil asetat (%8.82) ve terpinen-4-ol (%4.25) olarak belirlenmiştir (Yalçın ve ark., 2007). Antakya, Samandağı ve Yayladağı'ndan toplanan *L. nobilis* L. yapraklarının hidrodistilasyonu ve GC-MS analizi sonucunda 25 bileşen belirlenmiştir. Bu üç bölgeden toplanan bitkilerin kimyasal bileşenlerinde belirgin bir fark olmamakla birlikte, Antakya'dan toplanan bitkiden elde edilen sabinen ve  $\alpha$ -terpineol bileşenleri Yayladağı ve Samandağı'ndan toplanan bitkilerden elde edilen sabinen oranına kıyasla daha yüksek oranda bulunmuştur. Antakya, Yayladağı ve Samandağı bölgelerinden toplanan tüm yapraklarda 1,8-sineol oranı en yüksek bileşen olarak tespit edilmiştir. Diğer ana bileşen ise  $\alpha$ -terpinil asetat ve sabinen olarak belirlenmiştir (Sangun ve ark., 2007). Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz'den toplanan *L. nobilis* L. yapraklarının kimyasal bileşenlerinin araştırıldığı bir çalışmada GC-MS analizi sonucunda ana bileşen olarak 1,8-sineol (ökaliptol) (%31.87-67.56),  $\alpha$ -terpinil asetat (%4.09-22.22),  $\alpha$ -terpineol (%0.94-16.08), linalool (%0.40-13.04), terpinen-4-ol (%2.31-9.22) ve sabinen (%0.56-9.08) bileşenleri tespit edilmiştir (Karık ve ark., 2015). Tunus'ta yürütülen, *L. nobilis* L. yapraklarından elde edilen uçucu yağların farklılıklarının (mevsimsel ve coğrafik) araştırıldığı diğer bir çalışmada, ana bileşenler 1,8-sineol (ökaliptol) (%29.6),  $\alpha$ -terpinenil asetat (%13.6), metil ögenol (%13.5), sabinen (%5.6), linalool (%4.7),  $\alpha$ -pinen (%4.1) ve terpinen-4-ol (%2.6) olarak bulunmuştur (Marzouki ve ark., 2009). Mevcut çalışmada *L. nobilis* L. bitkisinin GC-MS analizi sonucunda ana bileşen olarak belirlenen 1,8-sineol (ökaliptol), diğer çalışmalarda da yüksek oran-

larda olduğu görülmüştür. Diğer önemli bileşenler  $\alpha$ -terpinil asetat, terpinen-4-ol ve sabinen olarak belirlenmiştir.

*R. officinalis* L. ve *L. nobilis* L. bitkilerinde yüksek miktarda elde edilen 1,8-sineol (ökaliptol) genellikle gıda aroma maddesi olarak kullanılır. Bunun yanında antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidan özellikleri de vardır (Xu ve ark., 2014). 1,8-sineol üst ve alt solunum yolu hastalıklarının (sinüzit, bronşit ve astım gibi) tedavisinde antienflamatuar amaçla kullanılmaktadır (Dörsam ve ark., 2015). Xu ve ark. (2014) farelerde 1,8-sineol maddesinin akut ve subakut toksisitesini araştırdıkları çalışmada maddenin LD<sub>50</sub> değerinin 3849 mg/kg olduğunu ve ölüm sebebinin solunum yetmezliğinden ileri geldiğini bulmuşlardır. 1,8-sineol bileşeninin 192.45 mg/kg/gün dozunda alınması durumunda farelerde böbrek ve karaciğer hasarı şekillendiği tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2014). Dörsam ve ark. (2015) tarafından yürütülen çalışmada 1,8-sineol maddesinin oksidatif stresi indüklediğini ve oksidatif DNA hasarına sebep olduğu ileri sürülmüştür.

1,8-sineolün kemirgenlerde akut, tekrarlanan dozlar ve üreme toksisitesi için klinik öncesi toksisitesi üzerine araştırma yapılmış, dişi farelerde oral 2000 mg/kg dozda 1,8-sineol uygulamasının başlangıçta zamanla yoğunlaşan sedasyon, tremor ve diyare belirtilerine yol açtığı, 24 saatten daha kısa bir sürede dispne ve nöbetler yanında tüm hayvanlarda ölüm meydana getirdiği bildirilmiştir. 1750 mg/kg dozda 24 saatten daha az bir sürede hayvanların yine tümünde ölüm meydana getirdiği bildirilmiştir. 1500 mg/kg dozunda hayvanlarda sedasyon ve tremor gözlenirken, ilk 24 saat içerisinde ya da takip edilen 14 gün boyunca hayvanlarda ölüm meydana gelmediği bildirilmiştir. Bu nedenle 1500 mg/kg <LD<sub>50</sub><1750 mg/kg olduğu belirlenmiştir (Caldas ve ark., 2016).

Yapılan bir diğer akut toksisite çalışmasında, 1,8-sineolün LD<sub>50</sub>'sinin yetişkin bir sıçandaki oral yol için 1280 mg/kg olduğu belirtilmiştir. 100 mg/kg'lık dozlarda 1,8-sineol ile tedavi edilen hayvanlarda gözle görülür bir toksisite, solunum problemi, ataksi, konvülsyon veya mortalite belirtisi olmadığı bildirilmiştir (Jalilzadeh-Amin ve Maham, 2015). Diğer türlerdeki LD<sub>50</sub> değerlerinin kobaylarda 2300 mg/kg (kas içi), köpeklerde 1500 mg/kg (deri altı) ve farede 50 mg/kg olduğu bildirilmiştir (McLean ve ark. 2007; Jalilzadeh-Amin ve Maham, 2015).

*R. officinalis* L. bitkisinden elde edilen ve organik bir terpen bileşeni olan  $\alpha$ -pinenin, antioksidan, antienflamatuar ve antikanserojen özellikleri vardır (Biradar ve Veeresh, 2013). Yapılan bir çalışmada  $\alpha$ -pinen bileşeninin, ladin örümcek akarı *Oligonychus ununguis* (Jacobi) için toksik olduğu bulunmuştur (Cook, 1992). Ozbek ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada  $\alpha$ -pinen bileşeninin İsviçre albino farelerinde akut toksisitesini ve 18 saat perhizde bırakılan diyabetik hayvanlardaki

hipoglisemik etkilerini değerlendirmiştir. Bu çalışma sonucunda intraperitoneal yolla verilen LD<sub>50</sub> değeri toplam hayvan sayısı için 2.076 mL/kg olduğu bulunmuştur. Ayrıca  $\alpha$ -pinen bileşeninin açlık kan şekeri seviyesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Özbek ve Yılmaz, 2017).

*L. nobilis* L. bitkisinde ayrıca yüksek oranda mutajenik ve genotoksik etkilere sahip  $\alpha$ -terpinil asetat tespit edilmiştir. Ratlarda yapılan bir çalışmada tekrarlanan doz toksisitesi için gözlenmeyen etki seviyesi 10000 ppm veya 400 mg/kg/gün olarak düşünülmüştür. Sprague Dawley ırkı ratla  $\alpha$ -terpinil asetat 750 mg/kg/gün dozda oral yolla verilmesi sonucunda, erkeklerde epididimis kanalında dejenerer spermatojenik hücre varlığı ile birlikte azalmış sayıda ya da tamamen spermatozoa yokluğu ve testislerde seminifer tubuler atrofi (orta ve şiddetli derecede) görülmüştür (Api ve ark., 2018).

Sonuç olarak hayvan sağlığı alanında bitki ve bitkisel ürünlerin kullanımının gün geçtikçe artmaktadır. Bu artış bitkilerin farmakolojik etkileri yanında kimyasal kompozisyonlarının ve ana bileşenlerinin olası toksik etkilerinin de bilinmesi zorunluluk haline gelmiştir. Dolayısıyla bitkilerden su distilasyonu, solvent ekstraksiyonu vb. yollarla elde edilen materyallerin içerdikleri biyoaktif kimyasal içerikleri ya da ana bileşen oranları ve olası toksik etkilerinin de ticari olarak satışa sunulan ürünlerde belirtilmesi, hayvan sağlığı uzmanları ya da hasta sahipleri tarafından kullanımları sonucu meydana gelebilecek olası toksik etkilerin en aza indirgenmesine katkı sağlayacaktır. Bitkisel materyalin elde edilme metodu ve kimyasal kompozisyonu doğrultusunda yapılacak deneysel in vitro ve in vivo çalışmalarla olası toksik etkilerin ve miktarlarının ortaya konulması da bu anlamda oldukça önemlidir. Bu çalışmalar ise kayıt altına alınarak gelecek nesillerle yol göstermiş olacaktır.

## Kaynaklar

- Akkemik Ü. Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları. Ankara: Orman Genel Müdürlüğü Yayınları 2018.
- Al-Rubaye F, Kadhim MJ, Hameed IH. Phytochemical profiles of methanolic seeds extract of cuminum cyminum using GC-MS technique. Int J Curr 2017; 8 (2): 114-24.
- Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sena P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol 1999; 37: 124-30.
- Altınok Yipel F, Yipel M. Etnoveteriner hekimlik (EVH). TVHB Dergisi 2014; 14(1-2): 79-82.
- Andersen A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-

- cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol* 2006; 25(1): 29-127.
- Api AM, Belsito D, Botelho D, Bruzec M, Burton Jr. GA, Buschmanne J, Daglif ML, Datea M, Dekantg W, Deodhara C, Francisa M, Fryerh AD, Jonesa L, Joshia K, La Cavaa S, Lapczynskia A, Liebleri DC, O'Briena D, Patela A, Penningj TM, Ritaccoa G, Rominea J, Sadekara N, Salvitoe D, Schultzk TW, Sipesl IG, Sullivana G, Thakkara Y, Tokuram Y, Tsanga S. RIFM fragrance ingredient safety assessment, terpinyl acetate (Isomer Mixture), CAS registry number 8007-35-0. *Food and Chem Toxicol* 2018; 122: 362-71.
- Aydın S, Başaran AA, Başaran N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J Agric Food Chem* 2005; 53(4): 1299-305.
- Azcan N, Kara M, Asilbekova DT, Ozek, T, Baser KHC. Lipids and essential oil of *Origanum onites*. *Chem Nat Compd* 2000; 36(2): 132-6.
- Azirak S, Rencuzogullari E. The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environ Toxicol* 2008; 23(6): 728-35.
- Bayan Y, Genc N, Kusek M, Gul F, Imecik Z. Determination of chemical compositions, antifungal, antibacterial and antioxidant activity of *Thymbra spicata* L. from Turkey. *FEB Fresenius Environ Bull* 2017; 26: 7595-9.
- Benli M, Yiğit N. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2005; 3(8): 1-8.
- Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Bocalon FlauzinoLG, SouzaMGM, TurattiCC, Andrade e Silva ML, MartinsCHG, A. da Silva Filho A, Cunha WR. Antibacterial activity of the essential oil from *rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z Naturforschung C* 2010; 65(9-10): 588-93.
- Biradar S, Veeresh B. Preclinical evolutionary study of alpha-pinene in l-arginine induced acute pancreatitis in rat. *Indian J Pharm Educ Res* 2013; 41: 73-8.
- Caldas GFR, Limeira MMF, Araújo AV, Albuquerque GS, Silva-Neto JC, da Silva TG, da Costa-Silva JH, de Menezes IRA, da Costa JGM, Wanderley AGI. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1, 8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol* 2016; 97; 297-306.
- Cook SP. Influence of monoterpene vapors on spruce spider mite, *Oligonychus ununguis*, adult females. *J Chem Ecol* 1992; 18(9): 1497-504.
- Dörsam B, Wu CF, Efferth T, Kaina B, Fahrer J. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. *Arch Toxicol* 2015; 89(5): 797-805.
- George P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants-An overview. *J Appl Pharm Sci* 2011; 1(6): 40-4.
- Güzel Y, Güzelşemme M, Miski M. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay province of Turkey. *J Ethnopharmacol* 2015; 174: 118-52.
- Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI, Taylor JM, Long EL, Nelson AA, Brouwer JB. Food flavourings and compounds of related structure. II. subacute and chronic toxicity. *Fd Cosmet Toxicol* 1967; 5: 141-57.
- Inan M, Kirpik M, Kaya DA, Kırıcı S. Effect of harvest time on essential oil composition of *Thymbra spicata* L. growing in flora of Adıyaman. *Adv in Environ Biol* 2011; 5(2): 356-8.
- Jalilzadeh-Amin G, Maham M. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. *Pharm Biol* 2015; 53(4): 594-9.
- Karaoğlan EES, Özgen U. Bazı origanum türleri üzerinde farmakognozik çalışmalar, Doktora tezi, Atatürk Üniv Sağ Bil Ens, Erzurum 2011; s. 4-161.
- Karık Ü, Çiçek F, Tutar M, Ayas F. Türkiye defne (*Laurus nobilis* L.) populasyonlarının uçucu yağ bileşenleri. *Anadolu ETAE Dergisi* 2015; 25(1): 1-16.
- Kendir G, Güvenç A. Etnobotanik ve Türkiye'de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış. *J Fac Pharm Hacettepe Univ* 2010; 30(1): 49-80.
- Lahlou M, Berrada R. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. *Flavour Fragr J* 2003; 18(2): 124-7.
- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 2005; 91: 131-7.
- Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Jos A, Cameán AM. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food Chem Toxicol* 2015; 81: 9-27.

- Marzouki HA, Elaissi A, Khaldi S, Bouzid S, Falconieri D, Marongiu B, Piras A, Porcedda S. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *Open Nat Prod J* 2009; 1: 86-91
- McLean S, Boyle RR, Brandon S, Davies NW, Sorensen JS. Pharmacokinetics of 1,8-cineole, a dietary toxin, in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): significance for feeding. *Xenobh* 2007; 37: 903-22.
- Mert A, Türkmen M, Bahadirli NP, Kaya DA, Ayanoğlu F, Öztürk Ş. Effects of different drying methods on components of *Thymbra spicata* L. essential from flora of Hatay (Turkey). Sixth International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS). October, 20-22, 2016; Bucharest-Romania.
- Özbek H, Yılmaz BS. Anti-inflammatory and hypoglycemic activities of alpha-pinene. *Acta Pharm Sci* 2017; 55(4): 7-14.
- Özcan MM, Chalchat JC. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int J Food Sci Nutr* 2008; 59(7-8): 691-8.
- Peixoto ITA, Furetti VF, Anibal PC, Duarte MCT, Höfling JF. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. *Rev Cienc Farm Basica Apl* 2010; 30(3): 235-9.
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr J* 2002; 17(1): 15-9.
- Saidi M, Ghafourian S, Zarin-Abaadi M, Mohavedi K, Sadeghifard N. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of black thyme (*Thymbra spicata* L.) essential oils. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2012; 71: 61-9.
- Sangun MK, Aydin E, Timur M, Karadeniz H, Caliskan M, Ozkan A. Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. Leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey. *J Environ Biol* 2007; 28(4): 731-3.
- Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55(3): 304-18.
- Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry* 2017; 220: 153-61.
- Ündeğer Ü, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chem Toxicol* 2009; 47(8): 2037-43.
- Wynn SG, Fougere B. *Veterinary Herbal Medicine*. Sydney: Elsevier Health Sciences 2006.
- Xu J, Hu ZQ, Wang C, Yin ZQ, Wei Q, Zhou LJ, Du YH, Jia RY, Li M, Fan QJ, Liang XX, He CL, Yin LZ. Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(4): 1495-501.
- Yalçın H, Anık M, Şanda MA, Çakır A. Gas chromatography/ mass spectrometry analysis of *Laurus nobilis* essential oil composition of northern cyprus. *J Med Food* 2007; 10(4): 715-9.
- Yipel FA, Yipel M. Etnoveteriner hekimlik (EVH). *TVHB* 2014; (1-2): 79-82.
- Yipel M, Tekeli IO, Sevin S, Yarsan E. Veterinary phytotherapy in cancer therapy: popular medicinal plants and classification by mechanisms or target organ/system. International Veterinary Students Congress. February, 16, 2018; Ankara-Turkey.
- Yipel M, Yipel FA, Tekeli IO, Güzel Y. Ethnoveterinary uses of medicinal plants in Mediterranean district, Turkey. *Rev Chim* 2017; 68(2): 411-6.



**The Effects of Pre-Superovulation GnRH and Short-Term Progesterone Administrations on the Quantity and Quality of Bovine Embryos\***

Uğur KARA<sup>1</sup>, Tayfur BEKYÜREK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute, Adana-TURKEY

<sup>2</sup>Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, Kayseri-TURKEY

**Corresponding author:** Uğur KARA; E-mail :ugurvetkara@hotmail.com; ORCID:0000-0002-7977-6826

**Atıf yapmak için:** Kara U, Bekyürek T. The effects of pre-superovulation GnRH and short-term progesterone administrations on the quantity and quality of bovine embryos. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2021; 18(1): 41-47

**Summary:** In this study we compared the quantity and quality of embryos recovered from Holstein donors superovulated after the induction of oestrus by human chorionic gonadotropin (hCG) and prostaglandin F<sub>2</sub>-alfa (PGF<sub>2</sub>α), followed by gonadotropin releasing hormone (GnRH) and short-term progesterone treatment (a modified protocol) and Holstein donors superovulated with a conventional protocol. In research, 3-year-old Holstein cows (n=20) were assigned into two equal groups. In Group I the animals received two injections of cloprostenol 11 days apart, and follicle stimulating hormone (FSH) was injected twice daily for 4 days at decreasing doses starting from the 9<sup>th</sup> day after oestrus. Cloprostenol was co-administered with the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> FSH injections. In Group II, the animals were treated with hCG at unknown stage of the oestrus cycle, and were given cloprostenol 7 days later. Buserelin was injected on the 7<sup>th</sup> day after oestrus, and PRID was inserted on 9<sup>th</sup> day after oestrus and was removed on day 14 (6<sup>th</sup> FSH injection). In Group II, FSH was administered on days 12-15 of the cycle, in a way identical to that of Group I, including the two cloprostenol. All cows were artificially inseminated three times at 12-hour intervals after last FSH injection. Buserelin was injected concurrently with the second artificial insemination. Embryos were collected on the 7<sup>th</sup> day after the second insemination embryo quality and developmental stage were evaluated based on their morphology. In the present study, total CL (8.50±1.90 and 9.40±1.52), total ova and embryo (7.5±2.03 and 7.0±1.61), total embryo (6.00±2.00 and 6.10±1.47), transferable embryo (5.50±1.84 and 5.50±1.59), degenerate embryos (0.50±0.22 and 0.60±0.40) and unfertilized ova (1.60±0.97 and 0.90±0.31) numbers were determined per donor in Groups I and II respectively. There was no statistically significant difference between the two protocols in terms of embryo quality and quantity (P>0.05). Thus, it was concluded that the tested protocol could be used as an alternative to conventional one as it allows fixed-time embryo collection in multiple donors with no need for oestrus detection.

**Keywords:** Embryo, gonadotropin releasing hormone, human chorionic gonadotropin, progesterone, superovulation

**Süperovulasyon Öncesi GnRH ve Kısa Süreli Progesteron Uygulamalarının Sığır Embriyolarının Sayısı ve Kalitesi Üzerine Etkisi**

**Özet:** Bu çalışmada, insan koryonik gonadotropini (hCG) ve prostaglandin F<sub>2</sub>-alfa (PGF<sub>2</sub>α) ile östruslarının indüklenmesinden sonra gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve kısa süreli progesteron uygulamasını takiben süperovulasyon uygulanan Holştayn donörler (modifiye protokol) ile klasik süperovulasyon uygulanan Holştayn donörlerden elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı karşılaştırıldı. Araştırmada, üç yaşlı 20 adet Holştayn ırkı inek iki eşit gruba ayrıldı. Grup I' deki hayvanlara 11 gün ara ile iki defa kloprostenol enjeksiyonu yapıldı ve östrus sonrası takip eden siklusun 9. gününden itibaren, günde iki kez dört gün süresince azalan dozlarda FSH enjeksiyonları uygulandı. Beşinci ve 6. FSH enjeksiyonları ile birlikte kloprostenol uygulamaları yapıldı. Grup II' deki hayvanlara ise siklusun herhangi bir döneminde hCG uygulaması yapıldı. Bundan 7 gün sonra kloprostenol enjeksiyonu yapıldı. Östrus sonrası devam eden siklusun 7. günü buserelin enjeksiyonu yapıldı. PRID siklusun 9. günü yerleştirildi ve siklusun 14. günü çıkarıldı (6. FSH enjeksiyonu sırasında). Grup II' de FSH ve kloprostenol uygulamaları siklusun 12-15. günlerinde Grup I' deki gibi yapıldı. Tüm inekler son FSH enjeksiyonundan sonra 12 saat ara ile üç kez tohumlandı. İkinci suni tohumlama ile eş zamanlı olarak buserelin enjeksiyonu yapıldı. İkinci tohumlama sonrası 7. günde embriyolar toplandı, morfolojilerine bağlı kalite ve gelişim evreleri değerlendirildi. Bu çalışmada donör başına sırasıyla Grup I ve Grup II' de toplam CL (8.50±1.90 ve 9.40±1.52), toplam oosit ve embriyo (7.5±2.03 ve 7.0±1.61), toplam embriyo (6.00±2.00 ve 6.10±1.47), transfer edilebilir embriyo (5.50±1.84 ve 5.50±1.59), dejenere embriyo (0.50±0.22 ve 0.60±0.40) ve unfertilize oosit sayıları (1.60±0.97 ve 0.90±0.31) tespit edildi. Sonuç olarak, iki protokol arasında embriyo sayısı ve kalitesi açısından istatistiksel olarak fark bulunamadı (P >0,05). Böylece çok sayıda donöre östrus takibine gerek duyulmadan sabit zamanlı süperovulasyona olanak sağladığından dolayı klasik süperovulasyon uygulamalarına alternatif bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Embriyo, gonadotropin salgılatıcı hormon, insan koryonik gonadotropini, progesteron, süperovulasyon

*Geliş Tarihi/Submission Date* : 07.09.2020

*Kabul Tarihi/Accepted Date* : 07.12.2020

\*This work is part of the doctorate thesis of the first author, which was financed under the "Project for the Improvement of the Anatolian Multi-coloured Cattle" (TAGEM/HAYSÜD/01-0902-03).



## Introduction

The main aim of use of embryo transfer (ET) is the production of a maximum number of calves from high-yield donors. Thereby, four to fivefold of the total number of progeny produced by a female during her lifetime can be produced with ET within a year (Kanagawa et al., 1995; Sağırkaya, 2009). Despite a long history of bovine superovulation research, significant commercial applications did not start until the early 1970s. For some 20 years thereafter, superovulation represented the primary tool for the production of cattle embryos (Mikkola et al., 2020). One of the main problems encountered with conventional superovulation protocols is individual variability in donor responses and as a result, the varying number of transferable embryos not collected (Mapletoft et al., 2002).

The administration of follicle-stimulating hormone (FSH) at the time of the emergence of the follicular wave is reported to have a positive impact on the ovarian response (Adams et al., 1994). When applying conventional superovulation protocols, the optimal response for the recovery of a maximum number of embryos is generated with hormone administration at the time of the emergence of the second follicular wave and requires periodical examinations on ovaries between 8<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> days during oestrus cycles. Fixed-time superovulation, embryo collection and transfer procedures following the exogenous control of the emergence of the follicular wave can be performed to avoid such problems (Bó et al., 2004). Although follicular wave and ovulation control programmes are incapable of preventing the individual variability of superovulation responses, they enable the initiation of treatment at any time point throughout the sexual cycle (Alkemade et al., 1993; Mapletoft et al., 2002; Bó et al., 2008). Furthermore, as they involve ovulation synchronization protocols, these superovulation procedures also enable the fixed-time insemination of donors and thereby, rule out the obligation to detect oestrus (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006).

Methods used for the synchronization of follicular wave emergence as part of superovulation protocols include oestradiol and progesterone administration, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) administration and follicle ablation. While the most common method used for follicular wave synchronization is the administration of oestradiol, the use of this hormone is prohibited in many countries whole of the world. Therefore, alternative methods need to be developed for the superovulation of donors in countries that do not allow the use of oestradiol because of concerns about the effects of estrogenic substances in the food chain (Bó and Mapletoft, 2012).

This study was aimed to investigate the possibility of

using fixed-time embryo collection and transfer for commercial production of bovine embryos without the need to oestrus detection. For this purpose, a conventional superovulation protocol compared to a modified protocol with hCG and PGF<sub>2</sub>α administration followed by GnRH and short-term progesterone treatment as concern the quantity and quality of embryos. Thereby, it has been aimed.

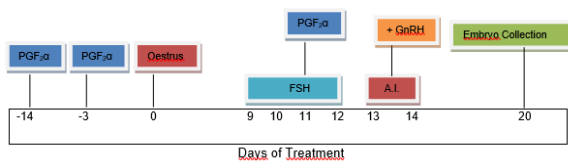
## Material and Methods

### Animals

Twenty healthy, reproductively sound and regularly cycling 3-year-old Holstein cows, with at least one previous delivery were used. Cows were kept at the Research Farm of the Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute (41.008857 latitude and 28.96747 longitude). The study was conducted in April 2016. The animals had a body condition score of 3-3.5 and weighed 500-550 kg and were at >100 days in milk. The average daily milk yield of the animals was 30.9±1.00 l in Group I and 32.0±1.12 l in Group II. The animals, which were assigned to two equal groups, were all fed on a total mixed ration (TMR) containing a combination of roughage (wheat straw, alfalfa hay and corn silage) and concentrate. Prior to the study, each animal underwent uterine and ovarian ultrasonographic examination for determine the possible uterine infections, status of genital tract and ovarium (5 MHz, Honda HS-101V, Japan). The experimental design of the study was approved by the Local Ethics Board for Animal Experiments of Erciyes University (Approval Number: 15/144).

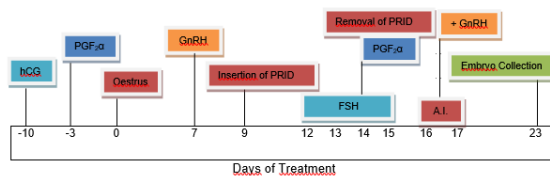
### Synchronization and superovulation

The superovulation protocols applied to the two study groups are presented in Figure 1 and Figure 2. The twenty cows included in the study were randomly assigned into two equal groups for superovulation treatment. The animals in Group I were intramuscularly (i.m.) injected twice with 500 µg of cloprostenol (Lutelen, Topkapı Pharmaceuticals and Premixes Industry and Trade Inc., Turkey), a PGF<sub>2</sub>α analogue, 11 days apart, at unknown stage of the oestrous cycle. Oestrous detection was performed in 8-hour intervals starting 48h after the second cloprostenol injection and the presence of clear mucous vaginal discharge was checked. Ovulation checks were performed by ultrasonographic examination 24 hours after the end of oestrus. A total amount of 400 mg FSH (Follitropin 700 IU, Bioniche Animal Health Canada Inc, Canada) was administered i.m., twice daily for 4 days at decreasing doses (Day 1 80/80 mg, Day 2 60/60 mg, Day 3 40/30 mg and Day 4 30/20 mg) starting from the 9<sup>th</sup> day after oestrus. Two i.m. doses of 500 µg cloprostenol were co-administered with the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> FSH injections (Fig. 1).



**Figure 1.** Superovulation protocol applied in Group I

The animals in Group II were given 3000 IU of hCG i.v. on day -10 (Chorulon 5x1500 IU+diluent, Intervet Veterinary Pharmaceuticals Marketing and Trade Inc., Turkey) and 7 days later (day -3) 500 µg of cloprostenol was injected i.m. to induce oestrus, the animals were monitored three times a day for oestrus detection, and the presence of clear mucous vaginal discharge was checked and observation 24 hours after the end of oestrus for ovulation. On day 7 after oestrus detection, a single i.m. dose of 10 µg of buserelin (Receptal, Veterinary Pharmaceuticals Marketing and Trade Inc., Turkey) was administered. On the 9<sup>th</sup> day of the oestrus cycle, a progesterone-releasing intravaginal device containing 1.55 g of progesterone (PRID DELTA®, Ceva Animal Health Joint Stock Company, Turkey) was inserted in the vagina, and a superovulation procedure similar to that applied in Group I, on days 12-15 of the induced cycle. The PRID was removed with 6<sup>th</sup> dose of FSH (Fig. 2).



**Figure 2.** Superovulation protocol applied in Group II

In both treatment groups, each animal was artificially inseminated three times at 12 h-intervals, starting 12 hours after the last FSH injection. At the time of the second insemination, all animals included in the study were also administered 10 µg of buserelin.

#### Collection and evaluation of the embryos

Uterine lavage was performed seven days after the second insemination. Prior to uterine lavage, each animal underwent ultrasonographic examination (5 MHz, Honda HS-101V, Japan and 5 MHz, Honda HS - 2000VET, Japan) to determine the total numbers of corpora lutea (CL) and follicles (>10 mm) in the ovaries. Uterine lavage was performed by two experienced veterinary practitioners, whilst embryo evaluation was conducted by auxiliary staff with specific expertise in this field.

Uterine lavage was performed using 1000 ml of lactated Ringer's solution (Ringer-Fleks, Eczacıbaşı-

Baxter Hospital Products Industry and Trade Inc., Ayazağa/Istanbul) containing 1% calf serum (Foetal Bovine Serum Sigma F 9665, Germany) and 0.1% kanamycin (Kanovet, Vetaş Veterinary Pharmaceuticals and Pesticides Joint Stock Company, Küçükçekmece/Istanbul) (Kanagawa et al., 1995).

Prior to the lavage procedure, epidural anaesthesia was administered with 4 ml of a local anaesthetic (L-Anestin, Alke Health Products Industry and Trade Inc., Turkey). Following uterine lavage, each donor was administered with 500 µg of cloprostenol i.m. and 500 mg of cephapirin benzathine (19 g, Metricure, MSD Animal Health, Turkey) by intrauterine route (Kara and Bekyürek, 2017).

The evaluation of embryo quality was conducted by auxiliary staff with specific expertise in this field, on the basis of morphological integrity according to the guidelines of the International Embryo Transfer Society (IETS) and were classified as Grade 1 and Grade 2 (Robertson and Nelson, 2010).

#### Statistical analyses

All analyses were performed using the SPSS 11.5 for Windows statistical software package. The numbers of embryos and ova obtained in the two study groups compared using the chi-square test. The Mann-Whitney U test was used to compare the treatment groups for the mean CL, mean ova and embryo, mean embryo, mean transferable embryo, Grade 1 embryo and Grade 2 mean embryo numbers. The recovery rates (Total Number of Ova/Embryos Recovered/Number of CL Detected x 100) of the two groups were compared with the t test. The findings obtained in this study are presented as mean values and percentages. All mean values are expressed as the mean ± standard error mean.

#### Results

All of the animals responded to the superovulation protocols applied, as confirmed by the presence of two or more corpora lutea on the day of uterine lavage. Embryos were recovered from all of the animals excluding one cow in Group I. A comparative presentation of the findings in the two study groups is given in Table 1 and Table 2.

No statistically significant difference existed between the treatment groups regarding CL, follicles (prior to the uterine lavage on the 7<sup>th</sup> day of the cycle, >10 mm follicles), ova and embryo, embryo, transferable embryo, Grade 1 and Grade 2 embryo numbers ( $P>0.05$ ). The groups did not statistically differ for recovery rate either ( $P>0.05$ ).

**Table 1.** Numbers of total corpora lutea, follicles, ova/embryos, embryos, transferable embryos, degenerate embryos and unfertilized ova collected after superovulation of Holstein cows with a group I or group II protocol

Parameter (Total number)	Group I (n=10)	Group II (n=10)
Corpora Lutea	85	94
Follicles	18	23
Ova/Embryos	75	70
Embryos	60	61
Transferable Embryos	55	55
Degenerate Embryos	1	0
Unfertilized Ova	15	9

**Table 2.** Mean values for total corpora lutea, follicles, ova and embryos, embryos, transferable embryos, grade 1 and 2 embryo numbers (Mean±SEM). No significant differences were observed between groups (P>0.05)

Parameter	Group I (n=10) X± SEM	Group II (n=10) X± SEM	P Value
Corpora Lutea Per Donor	8.50±1.90	9.40±1.52	0.544
Follicles Per Donor	1.80±0.81	2.40±1.63	0.107
Ova/Embryos Per Donor	7.50±2.03	7.00±1.61	0.847
Embryos Per Donor	6.00±2.00	6.10±1.47	0.493
Transferable Embryos Per Donor	5.50±1.84	5.50±1.59	0.675
Grade 1 Embryos	4.40±1.50	4.90 ±1.37	0.731
Grade 2 Embryos	1.00±0.47	0.60±0.30	0.732
Degenerate Embryos Per Donor	0.50±0.22	0.60±0.40	0.720
Unfertilized Ova Per Donor	1.60±0.97	0.90±0.31	0.839
Recovery Rate (%)	88.23 %	74.46 %	0.257
Number and Percentage of Grade 1 Embryos	45 (63.4)	49 (76.6)	0.250
Number and Percentage of Grade 2 Embryos	10 (14.1)	6 (9.4)	0.250
Number and Percentage of Unfertilized Ova	16 (22.5)	9 (14.1)	0.250

X: Mean; SEM: Standard Error Mean

## Discussion and Conclusion

For many years, practitioners have been initiating superstimulatory treatments during the midcycle (i.e., 8 to 12 days after oestrus) (Bó and Mapletoft, 2012). Superovulatory response has been shown to be higher when gonadotropin treatments are initiated precisely at the time of follicular wave emergence rather than 1 or 2 days later, making it necessary to synchronize the timing of follicular wave emergence in groups of animals (Nasser et al., 1993; Bó and Mapletoft, 2012).

In current study, we demonstrated the effects of pre-treatment by GnRH and short-term progesterone treatment on fixed-time embryo collection and the quantity and quality of embryos in Holstein cows. It has been shown that following GnRH-induced ovulation (Macmillan and Thatcher, 1991), a new follicular wave will emerge approximately 2 days later. However, follicular wave emergence occurs only when GnRH induces ovulation, if GnRH is administered when the dominant follicle is immature or post-mature, ovulation may not occur and a new follicular wave will not emerge (Martinez et al., 1999). Ovula-

tion rates after GnRH treatment at random stages of the oestrous cycle in cows have been reported to range from 44.3 % (Colazo et al., 2009) to 85 % (Pursley et al., 1995). Therefore, the animals were treated with hCG at unknown stage of the oestrus cycle to induce of dominant follicle ovulation and were given cloprostenol 7 days later to induce oestrus in Group II. On day 7 after oestrus detection, GnRH was administered to induce of dominant follicle ovulation of first follicular wave. On day 9 of the oestrus cycle, a progesterone-releasing intravaginal device was administered to control of second follicular wave emergence.

In the present study, no statistically significant difference was detected between the treatment groups for the mean CL, follicles, ova and embryos, embryos, transferable embryos, Grade 1 embryos, Grade 2 embryos, degenerate embryos and unfertilized ova numbers (P>0.05). In the present study, the recovery rate of Group I was found to be higher than that of Group II (88.23% and 74.46%, respectively) (P>0.05). The mean CL of Group II was found to be higher than that of Group I (9.40±1.52 and 8.50±1.90, respectively) (P>0.05). The unfertilized ova of Group I was found to

be higher than that of Group II ( $1.60 \pm 0.97$  and  $0.90 \pm 0.31$ , respectively) ( $P > 0.05$ ). The obligation to continuously monitor oestrus and, in case of multiple donors, ensure that all donors enter oestrus at the same time is a disadvantage of conventional superovulation procedures (Bó and Mapletoft, 2012). In the present study, the similar results obtained in the two treatment groups suggest that fixed-time A.I. and embryo collection could be applied to multiple donors after superovulation with no need for oestrus detection.

In previous studies, better results have been reported regarding CL number ranging between  $11.54 \pm 1.63$  and  $27.2 \pm 2.1$  (Lovie et al., 1994; Baracaldo et al., 2000; Caccia et al., 2000; Köse et al., 2006; García et al., 2012), ova and embryos ranging between  $8.5 \pm 1.3$  and  $17.4 \pm 9.9$  mber (Baracaldo et al., 2000; Caccia et al., 2000; Andrade et al., 2003; Carballo et al., 2010; García et al., 2012), for embryos ranging between  $7.2 \pm 1.4$  and  $10.1 \pm 1.2$  (Baracaldo et al., 2000; Caccia et al., 2000; Carballo et al., 2010), and for transferable embryos  $5.85 \pm 1.48$  and  $9.8 \pm 8.1$  (Baracaldo et al., 2000; Caccia et al., 2000; Andrade et al., 2003; Köse et al., 2006; Carballo et al., 2010). On the contrary other researchers have reported lower values ranging between  $6.1 \pm 0.9$  and  $8.4 \pm 1.4$  for CL (Kim et al., 2001; Bülbül et al., 2010),  $3.1 \pm 1.0$  and  $6.3 \pm 1.3$  for ova and embryos (Lovie et al., 1994; Kim et al., 2001; Bülbül et al., 2010),  $2.3 \pm 0.9$  and  $4.7 \pm 1.8$  for embryos (Lovie et al., 1994), and  $2.3 \pm 0.8$  and  $4.7 \pm 1.6$  for transferable embryos (Lovie et al., 1994; Kim et al., 2001; Bülbül et al., 2010). Grade 1 embryos ranging from  $1.9 \pm 0.3$  to  $4.7 \pm 0.37$  (Goulding et al., 1990; Köse et al., 2006; Wock et al., 2008; Bülbül et al., 2010; Kara and Bekyürek, 2017), and Grade 2 embryos ranging from  $1.1 \pm 0.4$  to  $4.5 \pm 0.41$  (Goulding et al., 1990; Köse et al., 2006; Wock et al., 2008; Bülbül et al., 2010) have been reported.

The differences in the superovulatory responses (mean number of CL and the embryo yield per donor) reported in previous research could be related to differences in the superovulation protocols applied, in terms of the number protocol of injections, administration route and dose of FSH (Lovie et al., 1994; Caccia et al., 2000; Carballo et al., 2010; García et al., 2012), or could be a result of differences in the day or stage of the sexual cycle chosen for FSH administration (Goulding et al., 1990; Andrade et al., 2003; Wock et al., 2008; Bülbül et al., 2010; Kara and Bekyürek, 2017). Differences in the follicular waves during which FSH administration was initiated (Goulding et al., 1990; Carballo et al., 2010). It has been indicated that any asynchrony between the emergence of the follicular wave and the initiation of superovulation procedures significantly reduces the ovarian response (Nasser et al., 1993). This might be one of the reasons for the inferior results obtained in

previous research in which conventional superovulation techniques were used (Nasser et al., 1993; Kim et al., 2001; Köse et al., 2006; Bülbül et al., 2010; Kaymaz, 2015).

Embryo recovery rates of 74.0% (Köse et al., 2006), 70% and 69% (Bülbül et al., 2010), and 83.5%, 41.5%, 47.6% and 51.5% (Taşdemir et al., 2016) have been reported in previous researchs. It is thought that, as also highlighted by Kanagawa et al. (1995), this difference may be related to several factors, such as the timing (day) of embryo collection, the type of catheter used, the positioning of the catheter during uterine lavage, and experience of the practitioner. Recovery rate found in this study (88.23% and 74.46% in Group I and Group II, respectively) was consistent with Köse et al. (2006) and Bülbül et al. (2010). However, the embryo recovery rates of Taşdemir et al. (2016) are lower than this study. Possible complications for embryo collection procedures and the performance of rectal palpation both due to the narrowness of the birth canal of Anatolian Black heifer that they studied might be the source of this difference, which is also highlighted by the researchers in the study of Taşdemir et al. (2016).

Use of GnRH at the onset of estrus increases the spontaneous LH peak, prevents delays in ovulation, and induces uniformly high postovulation progesterone concentrations (Kaim et al., 2003). In addition, in the study which administered LH for the induction of ovulation (Carballo et al., 2010), number of ova/embryos, embryos and transferable embryos were higher than present study. But, this difference was predicted to be sourced from preferred superovulation protocol rather than administration of different hormones (GnRH/LH) for induction of ovulation.

Some researchers have indicated that the administration of a low dose of eCG (equine chorionic gonadotropin) prior to superovulation increases the number of embryos recovered (Caccia et al., 2000; Barros et al., 2008). This result obtained with the use of eCG has been attributed to the longer lasting FSH-like effect of this hormone, resulting in a greater number of follicles recruited into the follicular wave in the emergence of follicular wave (Saumande et al., 1978; Schams et al., 1978; Mikel-Jenson et al., 1982; Moor et al., 1984; Dieleman et al., 1993).

The assessment of the results obtained in the present study suggests that by means of superovulation after GnRH and progesterone administration, one of the problems encountered in commercial in vivo bovine embryo production, namely, the obligation to monitor oestrus, can be ruled out and multiple donors fixed-time embryo collection from multiple donors can be applied with no need for oestrus detection. Furthermore, it has also been ascertained that by con-

trolling the emergence of the second follicular wave, a satisfactory superovulator ovarian response can be achieved (Bo' et al., 2004).

In conclusion pre-superovulation GnRH and short-term progesterone administration (modified protocol) and conventional superovulation protocols were proven equally effective in terms of the number and quality of the embryos recovered ( $p > 0.05$ ). However, periodic ultrasonographic examinations are required during 8<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> days of oestrus cycle in conventional protocols, due to the requirement of concurrently applied superovulation protocol with the emergence of the second follicular wave for multiple donors (individual differences in days of emergence of follicular waves in donors).

As a result of the applied procedure of 1) GnRH and short-time progesterone treatment, 2) its synchronization with follicular wave, 3) superovulation protocol concurrently applied with the emergence of the second follicular wave may offer the advantage of initiating super stimulatory treatments at a time that is optimal for follicle recruitment in Holstein cows.

#### Acknowledgements

We would like to thank the Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute and General Directorate of Agricultural Research and Policies for their contributions.

#### References

- Adams GP, Nasser LF, Bó GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 1103-13.
- Alkemade S, Murphy B, Mapletoft R. Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins. Proceedings of the Twelfth Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association, Portland, Maine. 1993: 1-19
- Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Teorio Filho F, Pina VM, Lunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC. The use of steroid hormones in superovulation of Neloro donors at different stages of oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 117-25.
- Baracaldo MI, Martinez M, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-50.
- Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: Replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20:152.
- Baruselli PS, Sá Filho M, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros MC, Bó GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 77-88.
- Bó G, Baruselli P, Chesta P, Martins C. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 89-101.
- Bó GA, Moreno D, Cutaia L, Baruselli PS. Hormonal manipulation of the estrous cycle in bovine embryo donors and recipients. *Acta Sci Vet* 2004; 32: 1-22.
- Bó GA, Mapletoft RJ. Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. Twenty Eighth Annual Meeting AETE. September 7-8, Saint Malo-France.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 2008; 69: 81-7.
- Bo' GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 31-40.
- Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Dursun Ş. Investigation of superovulation response in Brown Swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16 (3): 463-8.
- Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 495.
- Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 358.
- Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 2009; 72: 262-70.
- Dieleman S, Bevers M, Vos P, de Loos F. PMMSG/anti-PMMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39: 25-42.
- García GA, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. Lengthening the super stimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 2012; 78(2): 353-60.

- Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 1990; 34: 767-78.
- Kaim M, Bloch A, Wolfenson D, Braw-Tal R, Rosenberg M, Voet H, Forman YI. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2012-21.
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Center MAFF. JICA-Japan, 1995.
- Kara U, Bekyürek T. The effect of double PGF<sub>2</sub> $\alpha$  administrations applied to donor before oestrus with synchronized CIDR on the number and quality of obtained embryos during embryo transfer in cattle. *J Health Sci* 2017; 26 (3): 204-10.
- Kaymaz M. Yardımcı üreme teknikleri. In: Semacan A, Kaymaz M, Findık M, Rişvanlı A, Köker A, eds. *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. İkinci Baskı. Malatya: Medipres, 2015; s. 695-811.
- Kim HI, Son DS, Yeon H, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee HJ, Yoon JT. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 2001; 55: 937-45.
- Köse M, Dursun Ş, Bülbül B, Kırbaş M. İsviçre Esmeri ineklerde FSH ile süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Hay Araş Derg* 2006; 16 (1): 1-6.
- Lovie M, García A, Hackett A, Mapletoft RJ. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to follitropin in Holstein cows. *Theriogenology* 1994; 41: 241.
- Macmillan KL, Thatcher WW. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991; 45: 883-89.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42(6): 601-11.
- Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 1999; 57: 23-33.
- Mikel-Jenson A, Greve T, Madej A, Edqvist L. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -treated cow. *Theriogenology* 1982; 18: 33-4.
- Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev* 2020; 32: 104-24.
- Moor R, Kruip T, Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology* 1984; 21: 103-16.
- Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-24.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-23.
- Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of embryos. Stringfellow DA, Givens MD, eds. In: *Manual of The International Embryo Transfer Society*. Forth Edition. Champaign: International Embryo Transfer Society 2010; 86-105.
- Sağırkaya H. Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg* 2009; 28 (2):11-9.
- Saumande J, Chupin D, Mariana J, Ortavant R, Mauleon P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. Sreenan JM, ed. In: *Control of Reproduction in the Cow*. The Hague: Martinus Nijhoff, 1978; p.195-224.
- Schams D, Menzer D, Schalenberger E, Hoffman B, Hahn J, Hahn R. Some studies on the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. Sreenan JM, ed. In: *Control of Reproduction in the Cow*. The Hague: Martinus Nijhoff, 1978; p.122-42.
- Taşdemir U, Karşahin T, Satılmış M, Kızıl SH, Kaymaz M. Various FSH administration on superovulatory response and embryo yield in Anatolian Black Heifers. *Kocatepe Vet J* 2016; 9(4):322-26.
- Wock J, Lyle L, Hockett M. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 $\beta$  at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 228.





## Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi

Özge SİDEKLİ, Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU

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

**Sorumlu yazar:** Özge SİDEKLİ; E-posta: vethek.ozge@gmail.com; ORCID: 0000-0002-4891-1968

**Atıf yapmak için:** Sidekli Ö, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile mikroRNA (miRNA) ekspresyon profillemesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 18(1): 48-56

### Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi

**Özet:** Gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak bilinen miRNA'lar ökaryotik canlılarda çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynamaktadır. miRNA'ların rollerinin ortaya konulması ile birlikte miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalar ile birlikte miRNA'ların bütün hücre ve doku tiplerinde eksprese olduğu ortaya konmuştur. miRNA ekspresyon profilinin ortaya konması için çeşitli yöntemler önerilmesine rağmen, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle RT-qPCR altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu derlemede; RT-qPCR ile miRNA ekspresyon profillemesi sürecindeki adımlar detaylı olarak özetlenmiş ve konu ile ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ekspresyon, miRNA, normalizasyon, RT-qPCR

### MicroRNA (miRNA) Expression Profiling by Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

**Summary:** miRNAs, known as post-transcriptional regulators of gene expression, play a crucial role in various physiological and pathological processes in eukaryotic organisms. As the roles of miRNAs have been revealed, the number of studies on miRNAs is increasing day by day. Studies have shown that miRNAs are expressed in all cell and tissue types. Although various methods have been proposed to demonstrate miRNA expression profile, RT-qPCR is considered as a gold standard technique due to its high sensitivity and specificity. In this review; the steps in the miRNA expression profiling process by RT-qPCR were summarized in detail and relevant literature knowledge was given.

**Key words:** Expression, miRNA, normalization, RT-qPCR

### Giriş

miRNA'lar; mesajcı RNA (messenger RNA; mRNA) transkriptlerine bağlanarak doğrudan gen ekspresyonunu düzenleyen 17-25 nükleotid (nucleotide; nt) uzunluğunda, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir (Guo ve Chen, 2014). miRNA'lar; hem gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel aşamada düzenlenmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunun baskılanmasında veya tamamen ortadan kaldırılmasında, hem de hücreler arası etkileşimde mRNA'lar gibi görev almaktadır. Bu fonksiyonel rolleri ile birlikte miRNA'lar hücre gen ekspresyonunun %60'ından fazlasının kontrolünden sorumludur (Kozomara ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar ile birlikte farklı genomik organizasyona sahip organizmalarda 2019 yılında miRbase veri tabanında 38.589 miRNA lokusu ve 48.860 olgun miRNA belirlenmiştir (Kozomara ve ark., 2019; Sidekli ve Korkmaz Ağaoğlu, 2019). Tanımlanan miRNA'ların bir kısmının dokuya spesifik olarak hücre içinde, büyük bir kısmının ise hücre dışı ortamda bulunduğu ortaya konmuştur (Mendell ve Olson, 2012; Weber ve

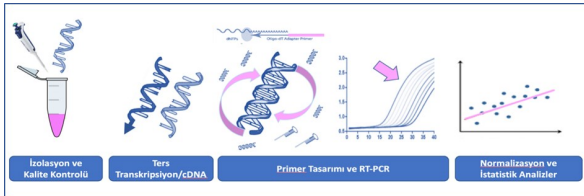
ark., 2010). Hücre içi miRNA'ların stres, hastalık ve çevresel uyarıcılara yanıt olarak kritik araçlar oldukları ve çeşitli dış faktörlerden kolayca etkilendikleri bildirilmektedir (Mendell ve Olson, 2012). Hücre dışı miRNA'ların ise kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, tükürük, semen ve anne sütü gibi çeşitli biyolojik sıvılarda ekspresyonlarının oldukça stabil olduğu saptanmıştır. Ayrıca hücre dışı miRNA'ların kararlı bir formda bulunarak, endojen RNAaz'lerden kendilerini korudukları için hücre dışı iletişimde rol oynadıkları rapor edilmiştir (Weber ve ark., 2010). Yapılan çalışmalar; hücre dışı miRNA'ların, yüksek veya düşük pH seviyelerinde, uzun süreli depolama ve birden fazla donma-çözme işlemleri gibi sert koşullara maruz kalmaları durumunda dahi ekspresyon seviyelerinin değişmeden kaldığını bildirmektedir (Bravo ve ark., 2007; Mraz ve ark., 2009). Ayrıca; hücre dışı miRNA'ların ekzozom gibi mikroveziküllerin yanı sıra Argonate 2 (Argonate2; AGO2) ribonükleoprotein kompleksi ile RNaz aktivitesinden kendilerini korudukları ve dolaşım sistemine geçebildikleri bildirilmektedir (Arroyo ve ark., 2011). Dolaşımda bulunan miRNA'ların ise; diğer hücre/doku tiplerine parakrin veya telektrin yol ile geçerek, hedefledikleri gen bölgelerini düzenledikleri belirlenmiştir (Cheng ve ark., 2013; Mendell ve Olson, 2012).

Geliş Tarihi/Submission Date : 08.10.2019

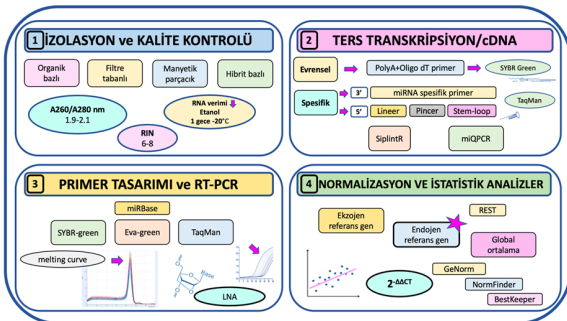
Kabul Tarihi/Accepted Date : 03.03.2020



miRNA'ların hücreye/doku tiplerine olan özgüllüğünden dolayı çeşitli hastalıkların patogenezi de biyobelirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir, bu nedenle de buna yönelik çalışmalara olan ilgi ve merak artmıştır (Benes ve Castoldi, 2010). Ancak; miRNA'ların GC içeriğine göre heterojen bir yapıya sahip olmaları, olgun miRNA'nın kısa olması (~22 nt), miRNA'ların ortak bir diziyeye sahip olmaması ve aynı aile içerisindeki miRNA'ların tek bir nükleotidin (örneğin; Let-7 ailesi) değişimi ile farklı yapısal özelliğe bürünmelerinden dolayı ekspresyon analizlerinin yapılmasında bazı zorluklara maruz kalmaktadır (Benes ve Castoldi, 2010; Guo ve Chen, 2014; Nolan ve ark., 2013). Bu yapısal zorluklara rağmen mikroarray, northern blot, yeni nesil sekanslama ve RT-qPCR ile miRNA ekspresyon profilleri başarılı bir şekilde analiz edilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019; Dellett ve Simpson, 2016). Bu yöntemlerin çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmasına karşın, gen ekspresyon çalışmalarında RT-qPCR yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedir (Dellett ve Simpson, 2016). RT-qPCR analizi ile doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi, ayrı ayrı optimizasyon gerektiren bir dizi kritik adıma bağlıdır (Bollati ve Dioni, 2019). Bu adımlar; RNA izolasyonu ve kalite kontrolü, ters transkripsiyon/komplementer DNA (complementary DNA; cDNA) sentezi, primer tasarımı ve RT-qPCR ile normalizasyon ve istatistiksel analizlerdir (Şekil 1).



**Şekil 1:** RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizindeki adımlar



**Şekil 2:** RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizindeki gerekli adımlar

miRNA ekspresyon profilinin ortaya konması için; RT-qPCR adımlarının dikkatli bir şekilde gözden geçirilmesi gerekmektedir (Dellett ve Simpson, 2016). RT-

qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizi için gerekli adımlar Şekil 2'de verilmiştir.

Bu derlemede; RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon profillemesi sürecindeki adımlar detaylı olarak özetlenmiş ve konu ile ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir.

### RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

miRNA izolasyonu için önerilen çeşitli yaklaşım metodları bulunmaktadır. Bu yaklaşım metodları genel olarak küçük RNA molekülleri (small RNA; sRNA)'nin zenginleştirilmesi için eklenen kritik adımlar dışında total RNA izolasyonu için kullanılan metodlara oldukça benzemektedir. Ortaya konan bu miRNA izolasyon metodları temelde dört ana izolasyon yöntemi altında sınıflandırılmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019). Bunlar; organik bazlı, filtre tabanlı, manyetik parçacık bazlı ve hibrit bazlı izolasyon yöntemleridir.

### Organik bazlı izolasyon yöntemi

Organik bazlı izolasyon yöntemi; total RNA izolasyonu için yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem; numune matrisinin fenol içeren bir çözelti içinde homojenleştirilmesi temeline dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar ile birlikte organik bazlı yöntemlerin kullanımı ile maksimum verim sağlanabildiği ortaya konmuştur (Bravo ve ark., 2007; Mraz ve ark., 2009).

### Filtre tabanlı izolasyon yöntemleri

Filtre tabanlı "spin basket" izolasyon yönteminde; küçük bir plastik tüpün dibinde bulunan membran veya membranlar (genellikle cam lifi, silis türeyi veya iyon değiştirme membranı) kullanılmaktadır. Filtre bazlı yöntemler oldukça kolay uygulanmasına rağmen organik bazlı yöntemlerden daha pahalı yöntemlerdir. Ancak, bu izolasyon yöntemlerinin yüksek verim beklenen çalışmalar için uygun olduğu bildirilmektedir (Blondal ve ark., 2013; Bollati ve Dioni, 2019).

### Manyetik parçacık bazlı izolasyon yöntemleri

Manyetik parçacık bazlı izolasyon yöntemleri, paramanyetik bir çekirdeğe ve RNA'ya bağlanmak üzere modifiye edilmiş 0.5-1 µm çapındaki küçük parçacıkların kullanımı prensibine dayanmaktadır. Bu izolasyon yönteminde; numuneler RNaz inhibitörlerini içeren bir çözeltide parçalanmakta ve küçük parçacıklar RNA molekülleriyle etkileşime girmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

### Hibrit bazlı izolasyon yöntemleri

Organik bazlı izolasyon metodu ile "spin basket" metodunun birleşimi olan bu yöntem küçük RNA (<200 nükleotitler) moleküllerinin zenginleştirilmesi ve/veya büyük RNA (>200 nükleotitler) bileşeninin çökeltilmesi prensibine dayanmaktadır (Mraz ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalar; organik bazlı izolasyon metodu içerisinde yer alan guanidinyum tiyosiyanat (Trizol / TRI-Reaktif) gibi konsantre kaotropik tuzlar ile az miktardaki bir örnekten fazla sayıda ve kalitede miRNA elde edilebildiğini göstermektedir (Bravo ve ark., 2007; Nolan ve ark., 2006). Trizol/TRI-Reaktif ile miRNA izolasyonu temel olarak total RNA izolasyonu ile benzer aşamaları içermektedir. Ancak bu yöntem ile yapılan miRNA izolasyon metodunda total RNA izolasyon protokolüne ek olarak çöktürme ve sRNA moleküllerinin zenginleştirilmesi aşaması da eklenmektedir (Mraz ve ark., 2009). Trizol yöntemi ile birlikte ticari olarak satılan çeşitli total RNA izolasyon kitleri bulunmaktadır (Nolan ve ark., 2013). Ancak 200 nt'den küçük RNA'ların etkin bir şekilde geri kazanımındaki zorluklardan dolayı total RNA izolasyonu için ticari olarak satılan filtre tabanlı izolasyon kitleri miRNA izolasyonu için uygun değildir (Mraz ve ark., 2009). miRNA gibi 200nt'den küçük sRNA'ların doğrudan izolasyonu için özelleştirilmiş çeşitli kitler bulunmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019; Nolan ve ark., 2013). miRNA izolasyonu için bu ticari kitlerin kullanımı zaman ve iş gücü yönünden araştırmacıya önemli avantaj kazandırmasına rağmen guanidinyum tiyosiyanat gibi organik bazlı miRNA izolasyon metodları ile daha kaliteli RNA elde edilebildiği (Mraz ve ark., 2009) ve ayrıca bu reaktiflerin kullanımının numunelerde genomik DNA kirliliğini engellediği ortaya konulmuştur (Dellet ve Simpson, 2016). Ancak; Guo ve Chen. (2014) miRVana ve Trizol ile yapmış oldukları total RNA izolasyon metodunda; miRVana ile daha kaliteli olgun ve öncü miRNA elde edildiğini saptamışlardır.

miRNA izolasyonu için hangi yöntemin kullanılacağı çalışma bütçesine ve araştırmacının çalışmadan beklentisine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca tercih edilen metod veya metodlar ile elde edilen RNA'ların verimlerinin beklenenden düşük olduğu durumlarda izopropanol alkol veya etanol ile 1 gece boyunca -20° C'de çöktürme basamağının uygulanması önerilmektedir (Mraz ve ark., 2009). Elde edilen total RNA moleküllerinin, bir sonraki adım için yüksek konsantrasyonlarda (>100 ng / mL) saklanması, ayrıca kalite ve kantite kontrollerinin de yapılması önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

Elde edilen total RNA'nın kalitesinin ve miktarının değerlendirilmesi; miRNA ekspresyon analizlerinin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu için oldukça önemlidir (Nolan ve ark., 2013). Bunun için Nano-Drop ve diğer spektrofotometre cihazları kullanılarak 260 ve 280nm (A260/A280 nm) ve 260 ve 230nm (A260/A230 nm) absorbans değerlerinde total RNA moleküllerinin kalite ölçümleri yapılabilmektedir. Ayrıca Bioanalyzer gibi otomatik kılcal elektroforez cihazları kullanılarak toplam RNA bütünlüğünün verimi ve kalitesi değerlendirilebilmektedir (Becker ve ark., 2010). RNA kalite ölçümlerindeki A260/A280 dalga boylarındaki oran, RNA saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bu doğrultu-

da; RNA için A260/A280 absorbans değerinin 1.9-2.1 oranına sahip olması önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

Otomatik kılcal elektroforez temeline dayanan Bioanalyzer gibi cihazlar sRNA (15-40 nt) moleküllerinin analizlerinde tercih edilen bir diğer yöntemdir. Ancak bu cihaz kullanılarak miRNA'ların kalite ve kantite ölçümünün yapılabilmesi için özel sRNA çipinin bulunması gerekmektedir (Becker ve ark., 2010). Ayrıca bu cihazlarda RNA bütünlüğünün doğru yorumlanması ve anlaşılabilmesi için RNA bütünlük değeri (RNA integrity number; RIN) ortaya konmuştur. RIN yazılım algoritması, 1'den 10'a kadar olan bir numaralandırma sistemi ile total RNA'nın sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Bu anlamda; 1 en fazla degradasyona uğramış, 10 ise en kaliteli olan RNA'dır. Çalışma için tercih edilen en uygun RIN değerinin 6 ile 8 arasında olduğu bildirilmektedir (Nolan ve ark., 2006).

### **Ters Transkripsiyon/cDNA Sentezi**

RT-qPCR ile gen ekspresyon çalışmalarında ilk aşama; elde edilen RNA'ların tasarlanan primerler yardımı ile cDNA'ya dönüştürülmesidir. Ancak; miRNA'ların dizi uzunluğunun tipik bir DNA primeri ile hemen hemen benzer olmasından dolayı miRNA'ların ters transkripsiyon basamağı klasik yöntemlerden farklıdır (Bollati ve Dioni, 2019; Nolan ve ark., 2013). Bu doğrultuda bu adım için "evrensel" ve "spesifik" RT primerinin kullanımına dayanan iki farklı yaklaşım metodu bulunmaktadır (Huang ve ark., 2015; Nolan ve ark., 2013; Benes ve Castoldi, 2010). İlk yaklaşım olan evrensel RT primerinin kullanımına dayanan metod; miRNA'nın 3' ucuna bir poli(A) polimeraz (poly(A) polymerase; PAP) kuyruğunun eklenmesi ve ardından oligo (dT) primerinin poliA kuyruğuna hibridize olması temeline dayanmaktadır. PoliA-oligo (dT) metodu genellikle SYBR® green bazlı analizlerde tercih edilmektedir (Nolan ve ark., 2013). Spesifik RT primerinin kullanımına dayanan diğer önemli yaklaşım metodunda ise; 3' ucuna miRNA ya spesifik tamamlayıcı, 5' ucuna "doğrusal (Linear)" primer (Benes ve Castoldi, 2010), "pincer" problemleri (Huang ve ark., 2015) ve "kök halka (stem-loop)" RT primerleri (TaqMan) (Nolan ve ark., 2013) gibi primerler kullanılmaktadır. qPCR çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen spesifik RT primerleri hedef miRNA'nın 3' ucuna spesifik olarak tasarlanmaktadır. Bu oligonükleotidler genel olarak TaqMan yöntemine dayanan qPCR analizlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bu oligonükleotidlerin olgun miRNA'nın tanı özgülüğünü artırdığı bildirilmektedir (Dellet ve Simpson, 2016; Nolan ve ark., 2013). Ancak tasarlanan primer ve/veya problemlerin hedeflenen miRNA'ya özgü olmasından dolayı reaksiyon yalnızca spesifik primere sahip olan miRNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesine izin vermektedir (Dellet ve Simpson, 2016).

Bu yaklaşım metodları dışında; Castoldi ve ark. (2011) tarafından miQPCR adı verilen yeni bir metod

ortaya konmuştur. miQPCR metodu; olgun miRNA'nın 3' hidroksil grubuna, T4 RNA ligaz 1 (tek iplikli RNA ligaz) aracılığı ile 26 nt uzunluğunda ki bir RNA/DNA adaptörü (miLINKER)'nün bağlanması temeline dayanmaktadır. Olgun miRNA dizisinin uzatılmasıyla birlikte miLINKER'in 3' ucundan özgülüğü ve duyarlılığı yüksek cDNA sentezi gerçekleştirilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010).

Evsensel ve spesifik RT metotları dışında Jin ve ark. (2016) tarafından miQPCR'a göre daha hızlı ve yüksek kalitede cDNA eldesini sağlayan ve RT reaksiyonu gerektirmeyen diğer bir prob ligasyon yöntemi (SplintR® Ligaz) ortaya konmuştur. İki aşamadan oluşan bu yöntemde hedef miRNA'ya hibridize olan 4-6 nt'lik iki DNA probu kullanılmaktadır. Bu DNA problemlerinin yüksek sıcaklıkta hibridizasyon özelliğinin artırılması ve geniş çaplı miRNA analizlerinde kullanımının uygun olduğu bildirilmektedir (Jin ve ark., 2016).

### Primer Tasarımı ve RT-qPCR

RT-qPCR analizlerinin özgülüğü ve duyarlılığı uygun primer tasarımına bağlıdır (Nolan ve ark., 2006). Primerin hedef diziye olan özgünlüklerinin artırılması, analiz sürecinde sekonder yapıların oluşumunu azaltmaktadır (Dellet ve Simpson, 2016). Bu nedenle; hedeflenen miRNA oligonükleotid dizileri ve bu dizilerin doğruluğu miRBase veritabanından (Kozomara ve ark., 2019) belirlenebilmektedir. miRBase dışında; TargetScan (Agarwal ve ark., 2015) veya miRTarBase (Chou ve ark., 2018) gibi veri tabanları da kullanılabilir.

miRNA'ya spesifik primerlerin tasarımı hedef sekansın GC içeriği, cDNA sentezi ve amplikon tespiti için kullanılan yöntemle bağlı olarak değişmektedir (Benes ve Castoldi, 2010). Aday primerler ile ilişkili olarak sekonder yapıların ve primer dimerlerinin oluşumunu en aza indirmek için nükleotitlerin ve optimum primer çiftlerinin boyları kısaltılabilmekte veya uzatılabilmektedir (Dellet ve Simpson, 2016). Hedef miRNA'ya spesifik primerler sRNAPrimerDB (Xie ve ark., 2019) veya miRprimer (Kang ve ark., 2018) gibi çeşitli algoritma programları kullanılarak tasarlanabilmektedir.

RT-qPCR analizlerinde çeşitli algoritma programları ile dizayn edilen primerler ile hedef diziler arasında öngörülen erime sıcaklığının (melting Temperature; Tm) fazla olduğu durumlarda çeşitli hassasiyet sorunları ile karşılaşılabilir (Benes ve Castoldi, 2010). Hassasiyet sorununun ortadan kaldırılmasında sentetik kilitli nükleik asit analogu (locked nucleic acid; LNA) gibi problemlerin kullanımı önerilmektedir (Nolan ve ark., 2013). Prob bazlı analizlerde kullanımı tercih edilen LNA problemleri; oligonükleotitlerin hibridizasyon özelliğini ve primerlerin Tm'lerini 2-8 °C'ye kadar arttıran kimyasal olarak modifiye edilmiş RNA nükleotitleridir (Dellet ve Simpson, 2016). LNA nükleotidin riboz halkası, hedef dizinin 2'-oksijen ve 4'

karbon atomlarına bağlanan bir köprü ile modifiye edilmektedir. Bu köprü; 3'-endo konformasyondaki riboz halkası ile kilit yapı oluşturur (Nolan ve ark., 2013). Ticari olarak satılan ve PCR reaksiyonuna spesifik olan bu LNA problemleri miRNA'lar arasında ayırmanın yapılmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Ancak; LNA nükleotitlerinin DNA nükleotitlerinden daha pahalı olması bu problemlerin miRNA ekspresyon çalışmalarında kullanımını sınırlandırmaktadır (Benes ve Castoldi, 2010; Nolan ve ark., 2013).

RT-qPCR; gerçek zamanlı olarak floresan ışığa ile birlikte hedef molekülün saptanması temeline dayanmaktadır (Nolan ve ark., 2006). qPCR analizi çeşitli floresan ışığa teknikleri (SYBR green®, EvaGreen® TaqMan prob, moleküler boncuk gibi) ile gerçekleştirilebilmektedir. Ancak, bu teknikler arasında miRNA analizi için SYBR green® (Nolan ve ark., 2006), EvaGreen® (Nolan ve ark., 2013) ve TaqMan prob (Nolan ve ark., 2006) temelli teknolojilerin kullanımı önerilmektedir.

SYBR green® ve Evagreen® floresan boyalar; çift zincirli DNA (double stranded; dsDNA)'ya bağlanarak floresan ışığa meydana getiren ucuz ve kullanımı kolay qPCR analiz yöntemleridir. Ancak bu boyalar amplifikasyon ürünleri dışında primer dimerleri gibi sekonder yapılarada bağlanabilmektedir (Nolan ve ark., 2006). Bu nedenle; bu yöntemlerde mutlaka erime eğrisi (melting curve) analizinin yapılması önerilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010). Amplifikasyon ürünlerinin tespitinde kullanılan bir diğer yöntem; TaqMan prob olarak bilinen hidroliz problemlerinin kullanımıdır (Nolan ve ark., 2013). TaqMan problemler PCR amplifikasyonu ile çoğaltılan PCR ürünlere bağlanma miktarına göre orantılı bir floresan madde artışı meydana getirmektedir. TaqMan prob teknolojisinde de primer-dimerler veya diğer spesifik olmayan amplifikasyon ürünler meydana gelebilmektedir. Ancak SYBR® green metodunun aksine yalnızca spesifik hedeflere bağlandığı için miRNA ekspresyon analizlerinde bu yöntemin kullanımı daha yaygındır (Benes ve Castoldi, 2010).

Androvic ve ark. (2017) miRNA ekspresyon analizinde kullanılmak üzere "two-tailed RT-qPCR" adı verilen yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Ayrıca; bu yöntemin hedeflenen miRNA'ları yüksek özgüllükte ayırt edilebildiğini ve miRNA ekspresyon analizlerinde yaygın olarak kullanılan TaqMan prob temelli RT-qPCR çalışma sonuçları ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

RT-qPCR kullanılarak miRNA ekspresyon profil analizinin doğruluğu büyük ölçüde PCR etkinliğine bağlıdır. RT-qPCR analizinin etkinlik analizi; genellikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bir dizi dilüsyon serisi ile ortaya konmaktadır (Dellet ve Simpson, 2016). Seyreltme serileri ile elde edilen eşik döngü (cycle threshold; Ct) değerinin logaritmik artış miktar-

larına göre standart eğri ve eğrinin eğiminin hesaplanması ile de PCR etkinlik değeri hesaplanabilmektedir (Becker ve ark., 2010). Ayrıca standart bir eğri oluşturmadan LinRegPCR veya FPK-PCR gibi yazılım programları kullanılarak PCR etkinlik değerleri saptanabilmektedir (Tellinghuisen ve Spiess, 2016). PCR analizinin kabul edilebilir etkinlik değeri; optimizasyon işlemine başlamadan önce araştırmacı tarafından tanımlanmalıdır. PCR etkinlik değerinin genel olarak %90'dan fazla olması önerilmektedir. Bununla birlikte; PCR etkinliği değeri; numunelerdeki PCR inhibitörlerinin varlığına, primer prob tasarımına ve araştırmacıya bağlı teknik nedenler ile değişebilmektedir (Dellet ve Simpson, 2016; Nolan ve ark., 2013).

### Normalizasyon ve İstatistik Analizler

RT-qPCR verilerinin analiz edilmesi için yaygın olarak mutlak ve göreceli ölçüm yöntemleri kullanılmaktadır (Schwarzenbach ve ark., 2015). Mutlak ölçüm; genel olarak RT-qPCR analizlerinde ortaya çıkan sinyallerin standart bir eğriyle ilişkilendirilmesi prensibine dayanmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu normalizasyon yönteminin miRNA miktarlarının tam olarak ortaya konması için yeterli olmadığı bildirilmektedir (Schwarzenbach ve ark., 2015). Göreceli miktar ölçümünde ise; hedef transkriptin qPCR analizi sonucu elde edilen verilerin referans genler ile karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu doğrultuda; miRNA ekspresyon analizlerinin doğru yorumlanabilmesi için çeşitli normalizasyon stratejileri ortaya konmuştur (Bollati ve Dioni, 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015). RT-qPCR verilerinin normalizasyonunda en yaygın kullanılan yaklaşımlar; analiz edilen bütün miRNA kümesinin global ortalamasının alınması, ekzojen sentetik oligonükleotid veya endojen miRNA'ların kullanılmasıdır (Faraldi ve ark., 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015).

miRNA ekspresyon verilerinin global Ct değerlerinin global ortalama (aritmetik ve geometrik ortalama)'sının alınması yaygın olarak büyük ölçekli miRNA ekspresyon çalışmalarında veri normalizasyonu için kullanılmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019). Bu yaklaşım metodunda belirli bir referans gen seçmek yerine, eksprese olan bütün genlerin global ortalaması bir normalizasyon faktörü olarak kullanılmaktadır. Elde edilen normalizasyon faktörünün miRNA ekspresyon sonuçlarının yorumlanmasındaki sorunları ortadan kaldırdığı düşünülmektedir (Faraldi ve ark., 2019).

Veri normalizasyonu için kullanılan ekzojen oligonükleotidler (örneğin; *Caenorhabditis elegans*'dan elde edilen cel-miR-39, cel-miR-54 veya cel-miR-238 gibi) ise; miRNA ekspresyon analizlerinde meydana gelebilecek teknik hatalara bağlı varyasyonların azaltılması için yaygın olarak tercih edilen stratejilerden biridir (Faraldi ve ark., 2019). Ekzojen miRNA'lar; örnek sette bulunan miRNA miktarındaki farklılıkları önle-

mek ve ters transkripsiyon aşamasının reaksiyon verimini arttırmak için genellikle ters transkripsiyon aşamasından hemen önce örnek sete eklenmektedir. Ticari olarak satılan bu sentetik kontrol ürünleri (spike-in) miRNA ekspresyon sonuçlarını daha güvenilir bir hale getirmesine rağmen mikrovezikül içerisinde taşınan miRNA'ların ve gen ekspresyon analizlerinde canlıya ait faktörlere bağlı miRNA ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin normalize edilmesinde güvenilir değildir. Bu nedenle endojen miRNA'lar ile birlikte kullanımları önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015).

Normalizasyon için kullanılan bir diğer önemli strateji ise; endojen miRNA'lardır. Genel olarak endojen miRNA'lar; örnek setteki büyük ölçüde ekspresyonu değişmeyen küçük nükleolar RNA (small nucleolar RNA; snoRNA)'lar arasından seçilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010; Nolan ve ark., 2013). snoRNA (örneğin; RNU6, RNU6B, RNU44 ve RNU48)'lar hücre ve dokularda sürekli eksprese olmalarına rağmen; bazı hastalık koşullarında ekspresyon seviyelerinde değişikliklerin meydana gelebileceği bildirilmektedir (Schwarzenbach ve ark., 2015). Buna rağmen; endojen miRNA'lar hedef genler ile aynı değişkenlerden etkilendikleri için en uygun referans genler olarak düşünülmektedir. Bu nedenle; bu normalizasyon yönteminde hedef miRNA'ların PCR amplikasyon ürünleri ile ilişkili Ct değerleri, endojen referans gen olarak seçilen miRNA'ların Ct değerleri ile karşılaştırılmaktadır (Schwarzenbach ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda normalizasyon için referans gen olarak kullanılabilecek olan snoRNA'ların seçiminde NormFinder (Andersen ve ark., 2004) ve GeNorm (Vandesompele ve ark., 2002) gibi yazılım algoritmalarının kullanılabileceği bildirilmektedir.

RT-qPCR analizlerinin tamamlanması ile birlikte her bir miRNA'nın miktarının karşılaştırılmasında  $\Delta\Delta CT$  ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) metodu yaygın olarak tercih edilmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu istatistiksel model ile analiz sonuçlarının ortaya konması için mirBridge (Tsang ve ark., 2010) veya miFRame (Backes ve ark., 2015) gibi programlar kullanılabilmektedir. Bu yazılım programları dışında çeşitli istatistiksel veya biyoinformatik analizlerde miRNA'nın GC içeriğinin tahmini, dizi uzunluğunun ve hedef gen analizinin belirlenmesi için OligoSCAN, Matlab ve Pajek gibi yazılım programları da yaygın olarak tercih edilmektedir (Chakraborty ve ark., 2015).

### MikroRNA Ekspresyon Analizine Etki Eden Etmenler

Kantitatif miRNA ekspresyon analizlerinin sonuçları çeşitli değişkenlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Bollati ve Dioni, 2019). Bu değişkenler; yaş ve beslenme gibi canlıya ait olan faktörler ile teknik nedenlere bağlı numunenin alınma zamanı, kontaminasyon, örnek tipi, taşıma, işleme ve depolama gibi çeşitli iş-

faktörlerdir (Bollati ve Dioni, 2019; Mraz ve ark., 2009). Grasedieck ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada; qPCR analizlerinde dondurma ve çözme işlemlerinin miRNA ekspresyon analizlerini doğrudan etkilediğini, bu nedenle de bu işlemlerin bazal seviyeye düşürülmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca; hücre dışı miRNA'ların ekspresyon analizlerinde numune matrisi olarak tam kan kullanılması amaçlanan çalışmalarda kullanılacak olan tüplerin EDTA (Nolan ve ark., 2013), heparin veya sitrat gibi antikoagülan içermesi gerektiği bildirilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

miRNA ekspresyon analizinde elde edilen veriler, izolasyon yönteminden ve izolasyon sonrası depolama koşullarından da etkilenmektedir (Mraz ve ark., 2009). Bravo ve ark. (2007) Trizol veya mirVana izolasyon kiti ile elde edilen ve -80 °C'de depolanan miRNA'ların oldukça kararsız bir yapıda olduklarını ortaya koymuşlardır. Ayrıca elde edilen miRNA'ların farklı depolama koşullarına bağlı olarak kaliteli cDNA'nın elde edilemediğini bildirmişlerdir. Mraz ve ark. (2009) ise; miRNA'ların farklı koşullar altındaki stabilitelemlerinin değerlendirilmesi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada; -80°C'de 14 gün, -80°C'de 10 ay boyunca saklanan ve taze olarak elde edilen 29 adet miRNA numunesinin ekspresyon seviyelerindeki değişimi incelemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda; miRNA'ların uygun koşullar altında saklama işlemi uygulandığında dondurma süresinin miRNA stabilitesini etkileyen önemli bir faktör olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; izole edilen miRNA'lardan elde edilen cDNA'ların 11 gün boyunca saklanan ve taze olarak elde edilen 29 adet miRNA numunesinin ekspresyon seviyelerindeki değişimi incelemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda; miRNA'ların uygun koşullar altında saklama işlemi uygulandığında dondurma süresinin miRNA stabilitesini etkileyen önemli bir faktör olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde; Grasedieck ve ark. (2012) miRNA'ların -80°C ve -20°C'de uzun süre depolanmaları ile birlikte miRNA ekspresyon stabilitesini incelemişlerdir. Elde etmiş oldukları sonuçlara göre; serumların 2-4 yıl boyunca -20°C'de saklanmalarının toplam miRNA ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı, ancak 6 yıldan daha uzun süreli depolama sonrasında miRNA ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüşün meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca; -80°C'de uzun süreli dondurmaya bağlı olarak sürekli dondurma ve çözme işlemlerinin miRNA miktarının azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Grasedieck ve ark., 2012).

Formaline sabitlenmiş parafine gömülü dokulardan (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE) da kaliteli miRNA elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Szafranska ve ark. (2008) dondurulmuş ve FFPE numunelerinde miRNA ekspresyon profilini incelemişlerdir. Her iki numune tipinde de miRNA ekspresyon seviyesinin benzer olduğu saptanmıştır. Ancak; FFPE numunelerinde tespit edilen miRNA miktarında %5 ile %8,6 arasında bir kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca; 10 yıl boyunca saklanan FFPE numunelerinde miRNA ekspresyonunun saptanabildiği ve miRNA'ların mRNA'lara göre daha az degradasyona uğradığı

saptanmıştır (Szafranska ve ark., 2008).

Ekspresyon çalışmalarında; kontaminasyon ve kullanılan örnek tipi analiz sonuçlarını etkileyen diğer etmenlerdendir. Örneğin; Cheng ve ark. (2013) plazma numunesinde trombosit kontaminasyonundan dolayı dolaşımdaki miRNA seviyelerinin değiştiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca; hücre dışı miRNA ekspresyon analizlerinde kanın plazma kısmı yerine serumunun miRNA ekspresyon analizlerinde kullanılması önerilmektedir. Kirschner ve ark. (2013) hemolizin miRNA ekspresyon seviyesine olan etkisini incelemişler ve sıklıkla normalizasyon için kullanılan bir miRNA olan endojen miR-16 konsantrasyonunun, kırmızı kan hücrelerinde mevcut olan en bol miRNA'lardan biri olduğunu bildirmişlerdir. Hemolize edilen plazma veya serum numunelerinde miR-16 konsantrasyonu daha yüksek ve değişken olmasından dolayı miR-16'nın hemolize edilen numunelerde normalizasyon için kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

miRNA ekspresyonunun canlıya bağlı beslenme, kondüsyon, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerden de etkilendiği ortaya konulmuştur (Blondal ve ark., 2013). Örneğin; miRBase veri tabanında serum ve plazma örneklerinde 1000'den fazla miRNA'nın ekspresyonunun stabil olduğu belirlenmiştir. Ancak; Blondal ve ark. (2013) incelemiş oldukları serum ve plazma numunelerinde 1000'den fazla miRNA'nın içinden yalnızca 114 adet miRNA'nın ekspresyonunun stabil olduğunu saptamışlardır. Elde edilen sonuçlar ile veritabanı arasındaki farkın canlıya bağlı faktörlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

#### **Veteriner Bilimleri Alanında miRNA'lar**

miRNA'ların, keşfedilmesi ile birlikte insan da dahil olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde sRNA moleküllerinin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozisi gibi birçok biyolojik sürece aracılık ettiği ortaya konmuştur (Mendell ve Olson, 2012; Su ve ark., 2010). miRNA'lar ile ilişkili bu hızlı gelişim ve ilerlemeler sonucunda, miRNA'ların ifade düzeylerinde meydana gelebilecek değişikliklerin çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarla ilişkili tanı kriteri olarak kullanılabilirler (Singh ve ark., 2019) ve hastalık patogenezesinde de (Stenfelt ve ark., 2017) rol oynayabilecekleri belirlenmiştir. Örneğin; insanlarda malign akciğer kanserinin ve kronik pankreatitis ile pankreas kanseri hastalıkları arasındaki farklılıkların saptanmasında non-invaziv miRNA tanı testleri geliştirilmiştir (Singh ve ark., 2019). miRNA'ların tanı kriteri olarak kullanılabilirliğine dair insanlarda bildirilen gelişmeler doğrultusunda; miRNA'ların veteriner bilimleri alanında da belirteç olarak kullanılabilirlikleri ileri sürülmüştür. Örneğin; Stenfelt ve ark. (2017) sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan Şap hastalığında eksprese olan miRNA'ları ortaya koymak için yapmış oldukları bir çalışmada miR-1281'in hastalığın akut ve kronik safhasında azaldığını buna karşın bta-

miR-17-5p (akut safhada) ve bta-miR-31 (kronik safhada) ekspresyon seviyelerinin arttığını saptamışlardır. Zheng ve ark. (2018) sığırlarda miR-185'in retensio sekondaryum hastalığında eksprese olduğunu ve hastalığın patogeneziinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Köpeklerde yapılan bir çalışmada ise insanlarda tümör ile ilişkili miRNA dizisine ait problemlerin %90'nının köpeklerde B ve T hücre kökenli tümörlerin tanısında kullanılabileceği belirlenmiştir (Uhl ve ark., 2011). Fleischhacker ve ark. (2013) ise miR-122 ve miR-193b'nin diyabetik kedilerde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Dolaşımda bulunan miRNA'ların çeşitli helmint enfeksiyonları ile de ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Guo ve Zheng, (2017) *Eshinococcus Multilocularis* ile enfekte olmuş farelerin dolaşımında parazit hastalığı ile ilişkili emu-miR-10 ve emu-miR-277'yi tanımlamışlardır.

miRNA'ların tanı amaçlı kullanımlarının yanı sıra terapötik amaçlı da kullanılabilecekleri ön görülmektedir. Örneğin; tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve kanser oluşumuna neden olmaktadır. Bu durumun tersi ise; "onkomiR" olarak bilinen bazı miRNA'ların kanser gelişimini arttırdığı saptanmıştır. Bu nedenle miRNA'ların etki şekli değiştirilerek kanserlerin gelişim sürecinin yavaşlatılabileceği ileri sürülmektedir (Singh ve ark., 2019).

miRNA'ların hastalık patogeneziindeki rolleri ve terapötik yaklaşım amaçlı kullanımlarını ortaya koyan bu umut verici gelişmelerin dışında reproduktif süreç gibi önemli biyolojik fonksiyonların yürütülmesinde de etkin bir role sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin; Donadeux ve ark. (2013) miR-21, miR-23a, miR-145, miR-503, miR-224, miR-383, miR-378, miR-132 ve miR-212'nin kısırlıklarda ovulasyon sürecini kontrol ettiklerini belirlemişlerdir. Gebelik sürecinde ise miR-92, miR-17 ve miR-27'nin anjiyogenezisi düzenlediği ortaya konmuştur. Ayrıca Li ve ark. (2012) laktasyon döneminde de miRNA ekspresyon seviyesinde farklılıklara rastlamışlardır. Laktasyon döneminde bulunan ineklerde yapmış oldukları bir çalışmada emzirmeye bağlı olarak 56 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesinin değiştiğini bildirmişlerdir.

## Sonuç

miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısının artması ile birlikte hücresel gen ekspresyonunun büyük bir kısmının miRNA'lar tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur. Ancak; hücre ve/veya dokuya spesifik miRNA'ların hedefledikleri gen bölgeleri ve etki mekanizmaları henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. miRNA'ların hedefledikleri gen bölgeleri ve etki mekanizmalarının belirlenmesi ile çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin moleküler alt yapısı anlaşılacak böylece farklı tanı ve tedavilerin geliştirilmesinde etkili olabilecektir. Bu nedenle; miRNA'ların potansiyel rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için, kullanımı

kolay ve farklı tanı laboratuvarları arasında tekrarlanabilirliği mümkün olan yüksek düzeyde standartlaştırılmış metodolojiler geliştirilmeli ve tercih edilmelidir. Teknolojide görülen gelişmelere paralel olarak; aday miRNA'ların, hedefledikleri gen bölgeleri ile etki mekanizmaları ve ekspresyon profillerinin; mikroarray, yeni nesil sekanslama, northern blot ile qPCR gibi çeşitli yöntemlerle belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntemler içerisinde; RT-qPCR moleküler analizlere yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle öne çıkmaktadır.

## Kaynaklar

- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015; 12: 4.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-50.
- Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: 144.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 5003-08.
- Backes C, Haas J, Leidinger P, Frese K, Grossmann T, Ruprecht K, Meder B, Meese E, Keller A. miF-Rame: analysis and visualization of miRNA sequencing data in neurological disorders. *J Transl Med* 2015; 13: 224.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaff MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010; 50: 237-43.
- Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010; 50: 244-9.
- Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma and other biofluids. *Methods* 2013; 59: 1-6.
- Bollati V, Dioni L. *Methods for Analyzing miRNA Expression*. Academic Press 2019; 379-405.

- Bravo V, Rosero S, Ricordi C, Pastori RL. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 1052-5.
- Castoldi M, Spasia MV, Altamura S, Elman J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparta R, D'Alessandro LA, Klingmullers U, Fleming RE, Longerich T, Groenes HJ, Benes V, Kauppinen S, Hentze MW, Muckenthaler MU. The liver-specific microRNA miR-122 controls systematic iron homeostasis in mice. *JIC* 2011; 121: 1386-96.
- Chakraborty M, Chatterjee A, Krithika S, Vasulu TS. A Statistical Analysis of MicroRNA: Classification, Identification and Conservation Based on Structure and Function. Dasgupta R. ed. In: *Growth Curve and Structural Equation Modeling*. Switzerland: Springer Proceedings in Mathematics & Statistics, 2015; pp. 223-58.
- Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, Goodman MT, Trait JF, Teewari, Pritchard CC. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS ONE* 2013; 8(6): 64795.
- Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 296-302.
- Dellett M, Simpson DA. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis. *Expert Rev Mol Diagnost* 2016; 16:407-14.
- Donadeux FX, Schauer SN. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2013, 45: 122-5.
- Faraldi M, Gomarasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G, Lombardi G. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Nature* 2019; 9: 1584.
- Fleischhacker SN, Bauersachs S, Wehner A, Hartmann K, Weber K. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. *Vet J* 2013; 197: 688-93.
- Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, Niess JH, Tuman H, Roughi A, Bloehdorn J, Liebisch P, Mertens D, Döhner H, Buske C, Langer C, Kuchenbauer F. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia* 2012; 26: 2414-6.
- Guo L, Chen F. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene* 2014; 544: 1-7.
- Guo X, Zheng Y. Expression profiling of circulating miRNAs in mouse serum in response to *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasitology* 2017; 144: 1079-87.
- Huang T, Yang J, Liu G, Jin W, Liu Z, Zhao S, Yao M. Quantification of mature microRNAs using pincer probes and real-time PCR amplification. *PLoS ONE* 2015; 10: 0120160.
- Jin J, Vaud S, Zhelkovsky AM, Posfai J, McCreynolds LA. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR ligase. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 116.
- Kang ST, Hsies YS, Feng CT, Chen YT, Yang PE, Chen WM. miPrimer: An empirical-based qPCR primer design method for small noncoding microRNA. *RNA* 2018; 24: 304-12.
- Kirschner MB, Kirschner MB, Edelman JJB, Kao ACH, Valley MP, Zandwijk NV, Reid G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet* 2013; 4: 94.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Jones-Griffiths S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: 155-62.
- Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics* 2012; 13: 731
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-delta delta c(t)</sup> method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012; 148: 1172-87.
- Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1-4.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1: 1559-82.
- Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR), *LGC* 2013; 1-99.

- Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem* 2015; 61: 1333-42.
- Sidekli Ö, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Gebelik Sürecinde Rol Oynayan mikroRNA (miRNA)'lar. *Lalahan Hay Araştırma Derg* 2019; 59(1): 36-48.
- Singh B, Mal G, Gautam S, mukesh M. Big from small: MicroRNA in Relation to veterinary sciences. *Advances in Animal Biotechnology* 2019; 447-53.
- Stenfeldt C, Arzt J, Smoliga G, LaRocco M, Gutkoska J, Lawrence P. Proof-of- concept study: profile of circulating microRNAs in bovine serum harvested during acute and persistent FMDV infection. *Virology* 2017; 14: 71.
- Su L, Zhao S, Zhu M, Yu M. Differential expression of microRNAs in porcine placentas on Days 30 and 90 of gestation. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(8): 1175-82.
- Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Rigganbach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn* 2008; 10: 415-23.
- Tellinghuisen J, Spiess AN. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. *Anal Biochem* 2016; 449: 76-82.
- Tsang J, Ebert MS, Van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microRNA functions and co-targeting networks using gene set signatures. *Mol Cell* 2010; 38: 140-53.
- Uhl WE, Suter S, Krimer P, Schliekelman P, Tompkins SM, Suter S. Identification of altered MicroRNA expression in canine lymphoid cell lines and cases of B- and T-Cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 950-67.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7).
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56: 1733-41.
- Xie S, Zhu Q, Qu W, Xu Z, Liu X, Li X, Li S, Ma W, Miao Y, Zhang L, Du X, Dong W, Li H, Zhao C, Wang Y, Fang Y, Zhao S. sRNAprimerDB: Comprehensive primer design and search web service for small non-coding RNAs. *Bioinformatics* 2019; 35: 1566-72.
- Zheng CY, Zou X, Lin HJ, Zhou BC, Zhang ML, Luo CH, Fu SX. miRNA-185 regulates the VEGFA signaling pathway in dairy cows with retained fetal membranes. *Therio* 2018; 110: 116-21.







## Acil Veteriner Hekimliğinde Ultrasonografik Muayene Yöntemleri

Özlem ŞENGÖZ ŞİRİN<sup>1</sup>, Mehti FİDAN<sup>1</sup>, Ali BUMİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

**Sorumlu yazar:** Özlem ŞENGÖZ ŞİRİN; E-posta: sengozyozlem@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2232-6349

**Atıf yapmak için:** Şengöz Şirin Ö, Fidan M, Bumin A. Acil veteriner hekimliğinde ultrasonografik muayene yöntemleri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2021; 18(1): 57-61

**Özet:** Bu derlemede travmada sonografi ile abdomen odaklı değerlendirme (AFAST), travmada sonografi ile toraks odaklı değerlendirme (TFAST) ve başucu akciğer ultrasonografik değerlendirme (VetBLUE) yöntemleri ele alınmıştır. Ultrasonografik muayeneyi gerçekleştirecek hekimin çok detaylı olmasa da belirli bir seviyede anatomi bilmesi ve kullandığı cihazın modlarına hakim olması gerekmektedir. Bunun dışında muayene teknikleri için yaklaşık 3 ile 6 dakika gibi kısa bir zaman yeterli olmaktadır. Ultrason birçok yardımcı tanı aracının aksine non-invazif güvenli ve daha hızlı bir yöntemdir. Çoğu araştırmacı bunun üzerine giderek acil kliniklerinde ultrason kullanarak hayati önem arz eden vakalarda hem hastanın zaman kaybını azaltmak, hem de hekimin daha kolay bir şekilde belirli hastalıkları elimine etmesini sağlayan birçok muayene tekniğinin geliştirilmesine yardımcı olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Acil veteriner hekimliği, AFAST, TFAST, ultrason, VetBLUE

### Ultrasonographic Examination Methods in Emergency Veterinary Medicine

**Summary:** In this review, abdominal focused assessment with sonography for trauma (AFAST), thorax focused assessment with sonography for trauma (TFAST) and bedside lung ultrasonographic examination (VetBLUE) methods in trauma are discussed. The physician who will perform the ultrasonographic examination should know a certain level of anatomy and be in control of the modes of the device. In addition, a short time of about 3 to 6 minutes is sufficient for these examination techniques. Unlike most diagnostic tools, ultrasound is a non-invasive, safer and faster method. Many investigators have increasingly assisted in the use of ultrasound in emergency clinics to reduce the time loss of patients in vital cases, as well as the development of several examination techniques that allow the physician to eliminate certain diseases more easily.

**Key words:** AFAST, emergency veterinary medicine, TFAST, ultrasound, VetBLUE

### Giriş

Travmatize ya da semptomatik rahatsızlıkları bulunan hastaların kardiyak ve respiratorik değerlendirilmesinde ultrason birinci tanı aracı olarak kullanılabilir. Abdomen odaklı ultrasonografik değerlendirme (AFAST), serbest abdomen sıvısının varlığını değerlendirmek için tasarlanan abdominal dört bölgeyi incelemeye odaklanırken, toraks odaklı ultrasonografik değerlendirme (TFAST) plevral ve perikardiyal boşlukta hava ya da sıvı varlığını tespit etmek için kullanılır. VetBLUE (başucu akciğer ultrasonografik değerlendirmesi), interstisyel-alveoler akciğer hasarını tespiti için kullanılan acil akciğer ultrasonografik muayene yöntemidir (Boysen ve ark., 2013). Plevral efüzyonlar, akciğer kisti ve apsesi, yaygın masif lezyonlar özellikle ultrasonografik görüntüleme yöntemi ile ayırt edilebilir (Şen, 2015).

### Travmada Sonografi ile Abdomen Odaklı Değerlendirme (AFAST)

AFAST muayene yöntemi, periton boşluğunda ser-

best sıvının tespiti için diyaframın, karaciğerin, safra kesesinin, dalağın, böbreklerin, bağırsakların ve idrar kesesinin görüntülenmesine dayanır. Yapılan çalışmalarda ultrasonografinin idrar kesesi rupturlarında ve idrar yolu obstrüksiyonlarında sensitivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Bumin ve ark., 2018). İdrar kesesinin muayenesinin tam olarak gerçekleştirilmesi için iğnin dolu olması gerekir (Bumin, 2000). Serbest sıvı anekoiktir ve ilgili olduğu bölgelerde organların etrafında üçgenler şeklinde toplanma eğilimindedir (Boysen ve ark., 2013).

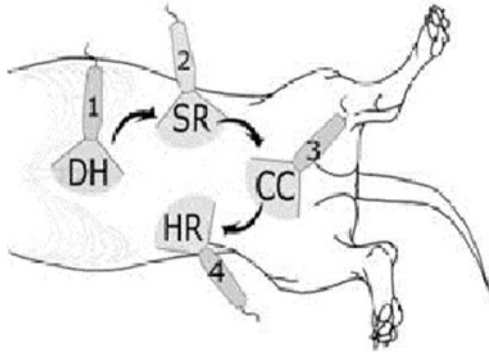
Abdominal travma geçiren köpeklerde 2 AFAST uygulama yöntemi vardır. Bunlardan ilki abdomenin dört bölümünde serbest abdomen sıvısının (tipik olarak kanamayı gösteren) varlığını belirlemek veya ekarte etmek için hızlıca tasarlanmış karın bölgelerinin AFAST odaklı olarak incelenmesidir.

İkincisi ise seri AFAST incelemeleri, özellikle abdominal sıvı skorunun (AFS) belirlenmesi ile birlikte kullanıldığında zamanla karın içindeki sıvı miktarındaki değişiklikleri saptamak için tasarlanmıştır. Seri AFAST incelemeleri her 2-4 saat arayla veya klinik bulgular doğrultusunda daha sık yapılmalıdır. FAST

incelemeleri, serbest abdominal sıvının tespiti için uzman olmayan kişiler tarafından yapılsa da görüntü çok spesifiktir, ancak penetran travma sonrası karın içi hasarın görüntülenmesi künt travmaya oranla daha zordur (Bruchim, 2018).

Muayenenin pozisyonu hastanın o anki yatış şekline göre belirlenebilir, bu hastanın daha fazla strese girmesini engeller (Boysen ve ark., 2013).

Köpeklerde AFAST uygulamasında ortalama sürenin 3 ile 6 dakika arasında olduğu bildirilmiştir (Bruchim, 2018). Diyafram hattının görüntülenmesi için 7.5 Mhz'lik sektör prob kullanılabilir (Şındak ve ark., 2006). Muayene tipik olarak, subksifoidden spleno-renal bölgeye, spleno-renal bölgeden sisto-kolik bölgeye sistolik bölgeden hepatorenal bölgeye olacak şekilde saat yönünü izleyen bir dönüşle değerlendirilir. Her bölgede, ultrason probu farklı yönlerde birkaç cm hareket ettirilebilir ve hedef organlar belirlenene kadar 45 derecelik bir açıyla havalandırılabilir. Sub ksifoid veya DH alanı iyi bir başlangıç noktasıdır çünkü safra kesesinin tespit edilmesini sağlar. Safra kesesinin görüntülenmesi için prob orta hattın sağına doğru yatırılır ve sıvı dolu safra kesesi anekoik görüne kadar manipülasyona devam edilir (Şekil1) (Bruchim, 2018). Sol böbreğin muayenesi için prob son kostanın hemen gerisinde göğüs bölgesine temas ettirilir. Sağ böbreğin muayenesi ventral olarak zordur, iri köpeklerde 11-12. interkostal aralıktan yapılır (Spence, 1997).



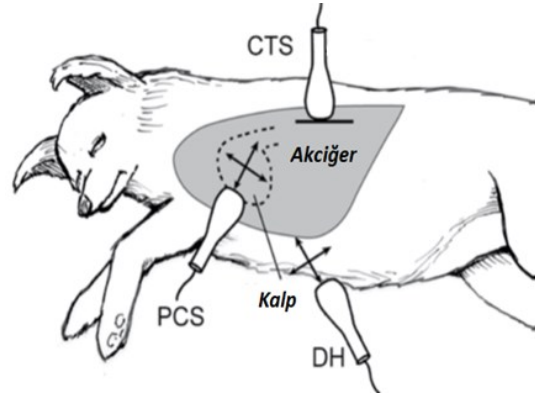
Şekil 1. AFAST muayene yöntemi (Boysen ve ark., 2013)

### Travmada Sonografi ile Toraks Odaklı Değerlendirme (TFAST)

TFAST'ın birincil amacı travmatize olmuş hastalarda hızlı bir şekilde pnömotoraksın (PTX) belirlenmesidir. İkincil hedefleri arasında plevral, perikardiyal boşluklarda ve torasik bölgedeki yaralanmaların tespiti bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda ultrasonografik muayenenin radyografik muayeneye kıyasla pnömotoraks hastalarında %95 oranında duyarlılığının olduğu ortaya koyulmuştur.

TFAST'in uygulamasında kullanılan görüntü açıları;

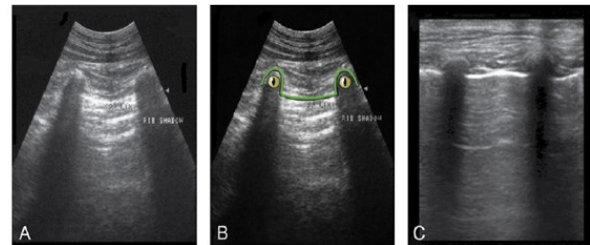
çift taraflı, sabit ve yatay olarak proba konumlandırılan göğüs tüpü bölgesi (CTS) görüntüleri, çift taraflı olarak uygulanan perikardiyal alan (PCS) görüntüleri ve beşinci nokta olarak, tek taraflı uygulanan diyaframatik-hepatik (DH) görüntüdür (Lisciandro, 2014) (Şekil 2).



Şekil 2. TFAST muayene görseli (Boysen ve ark., 2013)

### Göğüs Tüpü Bölgesinin Değerlendirilmesi

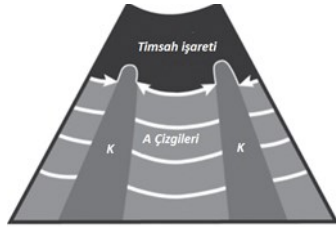
Göğüs tüpü bölgesi (CTS) görüntüsü 8. ve 9. interkostal aralıklardan probu dorsalden ksifoid bölgeye yönlendirilerek yapılan görüntüleme işlemi olarak tanımlanmaktadır. Prob göğüs tüpü bölgesi konumuna getirildikten sonra, tüm akciğer ultrasonografisi için standart oryantasyon olan pulmoner-plevral çizgiyi (ara yüz) tanımlayan gator (timsah) işareti bulunur (Şekil 3). İnterkostal aralığın plevral tarafı boyunca, pulmoner plevral çizgiyi (PP çizgisi) temsil eden proksimal parlak beyaz çizgi (hiperekoik) görüntülenir. Basitçe, PP-hattı anatomik olarak akciğerin torasik duvara boyunca inspirasyon ve ekspirasyonla kayması gereken yerleri temsil eder (Lisciandro, 2014). Akciğer ekspirasyon ve inspirasyon sırasında torasik duvara doğru kayar ve geri gelir. İnsan tıbbında hareket, akciğer kayması olarak adlandırılmıştır (Volpicelli ve ark., 2012). Ancak, veteriner hekimliğinde kayma izi terimi kullanılmıştır (Boysen ve ark., 2013; Lisciandro ve ark., 2008; Nyland ve ark., 2002).



Şekil 3. TFAST muayenesinde timsah görünümü (Lisciandro, 2014).

### Göğüs Tüpü Bölgesindeki Bulgular

Kayma İşareti (A Çizgileri): Kayma izi, akciğerin parlak beyaz proksimal çizgiden PP çizgisi tarafından temsil edilen torasik duvara kadar hareket etmesi olarak tanımlanır. Normal akciğerin hava ile dolmasıyla, hava reverbasyon artefaktı PP çizgisinin ötesinde A çizgileri adı verilen eşit paralel çizgiler olarak görüntülenir (Şekil 4). Bunların PP çizgisi ile karıştırılmaması gerekir çünkü yapay A çizgileri boyunca kayma görülmez. Kayma işareti gerçek zamanlı bir bulgudur. Normal akciğerin ve pnömotoraksın (PTX) standart B-modundaki görüntüleri tamamen aynıdır (Şekil 5). Timsah işareti, kayma işaretinin varlığı veya yokluğuyla ilgili doğru değerlendirme için gereklidir. Kayma işaretinin varlığı PTX'i elimine eder (Lisciandro, 2014).



Şekil 4. Kayma işareti A çizgilerinin görüntülenmesi (Lisciandro, 2014)



Şekil 5. Normal akciğer ve pnömotoraksın B-mod görüntüsü aynıdır (Lisciandro, 2014)

Ultrasonografik Akciğer Roketleri (B çizgileri): Ultrasonografik akciğer roketleri (ULR), ultrasonografik olarak sıvının hemen havaya bitişik olduğu yerlerde akciğer çevresi boyunca meydana gelir.

Önemli olarak, ULR'ler tüm ultrason ekranını doldursalar da, bu artefaktlar sadece akciğer yüzeyinin ilk 1 ila 3 mm'si içinde sıvı ile havanın yan yana durmasını temsil ederler (Soldati ve ark., 2011). Bu artefaktın avantajları:

1- ULR'ler kolayca tanımlanabilir (kayma işaretinden daha belirgindir).

2- ULR'ler, torasik duvar boyunca bu noktada PTX'i hızlı bir şekilde ekarte eder.

3- ULR'lerin bölgesel dağılım gösterme şekilleri, akciğer koşullarını teşhis etmek için kullanılabilir, çünkü ULR'ler, ıslak akciğer olarak adlandırılan interstisyel ödem formlarını temsil eder.

ULR'ler, hiperekoik parlak beyaz çizgiden veya PP çizgiden köken alır. Bununla birlikte, ULR'ler, inspirasyon ve ekspirasyon hareketinden köken alan sarımsı gibi sallanan, hiperekoik çizgilerin solmamasıyla kayma işaretinden farklıdır (Boysen ve ark., 2013).

### Basamak Görünümü

TFAST sırasında PP hattının normal lineer devamlılığında bozulma gözlenmiştir. Bu yüzden bu terim TFAST muayenesinde kullanılmaktadır. Geniş göğüslü köpeklerde abdominal koşullara bağlı olarak (asites, gebelik) yanlış pozitif görünüm alınabilir bunu önlemek için 7. ve 8. interkostal aralıktan da muayene yapılmalıdır (Lisciandro ve ark., 2008).

### Akciğer Noktasının Belirlenmesi ve Pnömotoraksın Derecelendirilmesi

Pnömotoraks 'hepsi ya da yok' şeklinde bir fenomen olarak kabul edilmiştir ki bu yanlıştır. Çünkü pnömotoraksın derecesi akciğer noktasının yeri belirlenerek değerlendirilebilir. Akciğer noktası, kollaps olmuş akciğerin torasik duvar ile temasın devam ettiği bölgedir. Genellikle ultrasonda kayma hareketlerinin ya da ULR'lerin görülmesiyle tespit edilir. Akciğer noktası, akciğerin torasik duvarla tekrar temas ettiğinin üçüncü bir işareti olan akciğer nabızı gözlemlenerek de bulunabilmektedir. Akciğer nabızı kayma işaretine benzemektedir. Bununla birlikte bu nabız solunumun yarattığı aşağı yukarı hareketlerine kıyasla kalp atışlarıyla birlikte ileri geri hareketleri şeklinde olmaktadır (Lichenstein ve ark., 2000; Volpicelli ve ark., 2012).

### Yaş Akciğer ve Kuru Akciğer Konsepti

Yaş akciğer (ULR'ler, aynı zamanda B çizgileri olarak da bilinen) ve kuru akciğer (kayma hareketi ile A çizgileri) konsepti ultrason konusunda uzman olmayan kişiler tarafından bile kolayca öğrenilebilmektedir. ULR'ler akciğer radyografisindeki Kerley B çizgilerine (interlobüler ödemi gösteren) benzemektedir ayrıca çeşitli akciğer koşullarının varlığı ile ilişkilidir (travma vakalarında akciğer kontüzyonlarının varlığı ya da travma dışı vakalardaki interstisyel ödem şekilleri gibi) (Lichtenstein ve ark., 2004; Soldati ve ark., 2011). Kuru akciğer konsepti pnömotoraksın olmadığı durumlarda kolayca görülebilmektedir (kayma hareketi ile A çizgilerinin görülmesi).

### Veteriner Yatakbaşı Akciğer Ultrasonografik Muayenesi (VetBLUE)

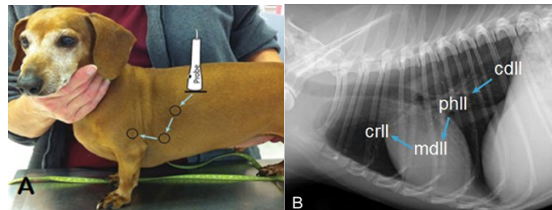
VetBLUE, bölgesel bazda ultrasonografik akciğer

bulgularını çoğu veteriner hekimin torasik radyografiyi yorumlama şekliyle tutarlı olarak tasarlanmıştır. Dahası, VetBLUE'nin basitliği dikkat çekicidir, çünkü ıslak ve kuru akciğerin, ultrason bulguları açık bir "tümü ya da hiçbiri" ultrasonografik olgusudur. (Lichtenstein, 2008; Volpicelli ve ark., 2012). Tedaviye yanıtın izlenmesinin yanı sıra solunum sıkıntısı olan hastalarda hızlı klinik etki için avantajlı olarak kullanılabilir (Lichtenstein ve ark., 2008; Soldati ve ark., 2011; Volpicelli ve ark., 2012). AFAST3 ve TFAST3'te olduğu gibi, VetBLUE, hasta değerlendirilmesinin ilk dakikası boyunca, bakım noktasında veya girişimsel prosedürler sırasında (oksijenizasyon, intravenöz kateter yerleştirilmesi ve intravenöz sıvıların uygulaması) triyaj tablosunda gerçekleştirilebilir. Uygun bir eğitim ile bu üç muayene süresi çok hızlıdır (Lisciandro ve ark., 2008; Lisciandro, 2011). Travma hastalarında pulmoner kontüzyonu destekleyen akciğer bulgularını tespit edebilmektedir (Lisciandro, 2013).

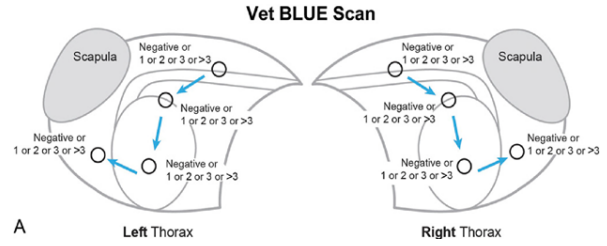
Travma dışı feline astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut aspirasyon pnömonisi ve diğer pnömonileri, pulmoner tromboembolileri ve neoplazi formlarını destekleyen solunum sıkıntısı çeken hastaların bölgesel olarak ortaya çıkan akciğer lezyonlarını tespit edebilmektedir. ULR sayısını sayarak ve VetBLUE bölgelerinde (0, 1, 2, 3, 3'ten büyük) dağılımlarını kaydederek akciğer kontüzyonlarının derecesini veya akciğer ödemi formlarını yarı nicel olarak ölçebilmektedir. Kardiyojenik ve kardiyojenik olmayan pulmoner ödem, pulmoner kontüzyonlar, pnömoniler, neoplaziler ve granülomatöz hastalıklar dahil olmak üzere birçok akciğer hastalıklarında tedaviye yanıtı seri muayeneler ile görüntüleyebilmektedir (Lisciandro, 2013).

### VetBLUE Uygulaması

VetBLUE'da kaudodorsal akciğer lobu (cdll) bölgesinin görüntülenmesinden sonra, prob perihilar akciğer lob bölgesine (phll), daha sonra orta akciğer lob bölgesine (mdll) ve son olarak da kraniyal akciğer lob bölgesine (crll) taşınır. Bu sitelerin her biri (phll, mdll, crll) siyah daireler ile temsil edilir. Nihai crll görünümü, axillar ve ikinci ve üçüncü interkostal boşluklara girmek için ön bacağı hafifçe ileri çekerek elde edilir. Aynı tarama karşı hemitoraksta tekrar edilir (Lisciandro ve ark., 2008; Lisciandro, 2011) (Şekil 6,7).



Şekil 6. A- VetBLUE hasta muayene sistematiği B- VetBLUE muayene şeması radyografik görünümü (Lisciandro ve ark., 2008; Lisciandro, 2011)



Şekil 7. VetBLUE görüntüleme ile akciğer muayenesi ve skorlanması (Lisciandro, 2013).

### Sonuç

Acil veteriner hekimliğinde ultrasonografi, gerek non-invaziv oluşu gerekse yoğun bakım ünitelerinde bulunan risk altındaki hastaları radyasyona maruz bırakmadan hızlı bir şekilde uygulanabilmesiyle önemli bir yardımcı teşhis ve tedavi takip aracıdır.

### Kaynaklar

- Bruchim Y. Use of TFAST and AFAST in emergency patients. World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings (WSAVA 43<sup>rd</sup>). September, 25-28, 2018; Singapur-Singapur.
- Bumin A. Köpeklerde idrar kesesi taşlarının radyografik ve ultrasonografik tanısı ve şırıjikal sağaltımı. Ankara Univ Vet Fak Derg 2000; 47: 213- 21.
- Bumin A, Şen Y, Ergin İ, Şenel OO, Özgermen DB. Radiological and ultrasonographical evaluation of lower urinary tract diseases in cats, Ankara Univ Vet Fak Derg 2018; 65: 73-8.
- Boysen S, Lisciandro GR. The use of Ultrasound for dogs and cats in the the emergency room: AFAST and TFAST. Vet Clin Anim Small Anim 2013; 43(4): 773-97.
- Lichtenstein D, Meziere G, Biderman P, Gepner A. The "lung point": An ultrasound sign specific to pneumothorax. Inten Care Med 2000; 26: 1434-40.
- Lichtenstein D, Meziere G, Biderman P, Gepner A. Ultrasound diagnosis of alveolar consolidation in the critically ill. Intensive Care Med 2004; 30: 276-81.
- Lisciandro GR. Abdominal and thoracic focused assessment with sonography for trauma, triage, and monitoring in small animals. J Vet Emerg Crit Care 2011; 21(2): 104-22.
- Lisciandro GR, ed. Focused Ultrasound Techniques for the Small Animal Practitioner. First Edition. Iowa: John Wiley and Sons, 2014; p.78.
- Lisciandro GR, Lagutchik MS, Mann KA, ve ark. Evaluation of a thoracic focused assessment with sonography for trauma (TFAST) protocol to detect pneumothorax and concurrent thoracic injury in 145 traumatized dogs. J Vet Emerg Crit Care 2008; 18

(3): 258-69.

Nyland TC, Mattoon JS, eds. Thorax. In Small Animal Diagnostic Ultrasound. Second Edition. Philadelphia: Saunders, 2002; p.81

Soldati G, Sher S, Testa A. Lung and ultrasound: time to reflect. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(2): 223-7.

Volpicelli G, Elbarbary M, Blaivas M, Lichtenstein DA, Mathis G. International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultrasound. Intensive Care Med 2012; 38(4): 577-91.

Spence S. Uygulamada ultrason ses uygulaması. Veteriner Cerrahi Derg 1997; 1: 59-61.

Şen Y, Bumin A. Ultrasonographic and thoracoscopic approaches for diagnostic evaluation of pleural effusion in dogs. Ankara Univ Vet Fak Derg 2015; 62 (2): 105-11.

Şındak N, Biricik HS. Köpeklerde karın içi organ hastalıklarının ultrasonografi ile değerlendirilmesi. YYÜ Vet Fak Derg 2006; 17(1-2): 75-9.

Veterinary Information Network. Use of TFAST and AFAST in Emergency Patients. <https://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=8896659&pid=22915&>; Accessed Date: 27.02.2019.





### Neuronal Lipofuscinosis in a Hairy Goat\*

Hamdi AVCI<sup>1</sup>, Sümbül Serap BİRİNCİOĞLU<sup>2</sup>, Erkmen Tuğrul EPİKMEN<sup>1</sup>, Ahmet AYDOĞAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Aydın-TURKEY

<sup>2</sup>Special A Pathology Laboratory, İzmir-TURKEY

<sup>3</sup>Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Pathology, Adana-TURKEY

**Corresponding author:** Ahmet AYDOĞAN; E-mail: aaydogan@cu.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2504-8150

**How the cite:** Avcı H, Birincioğlu SS, Epikmen ET, Aydoğan A. Neuronal lipofuscinosis in a hairy goat. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 18(1): 57-59

**Summary:** In the present case, neuronal lipofuscinosis was determined in a three-year-old female hair goat. The systemic necropsy was performed. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid schiff stain (PAS), Schmorl's and long Ziehl-Neelsen (ZN) methods for lipofuscin; Turnbull's blue method for hemosiderin and melanin removal method II for melanin. Unstained deparaffinized sections were examined microscopically for fluorescence in transmitted ultraviolet light. In addition, samples of pons and medulla oblongata were collected and processed for transmission *electron microscopy* investigations. Macroscopically, the meninges were opaque and the cerebral hemispheres had firm consistency. Microscopically, pigment granules in varying intensity were observed in the cytoplasm of the neurons of the pons and medulla oblongata. Red or yellowish-brown granules were usually seen in perinuclear localization, and filled all cytoplasm of some neurons. Moreover, meningeal and perineuronal edema, perivascular hemorrhage and neuronal degeneration were prominent histopathologic findings. The granules were positively stained with PAS, Schmorl's and long ZN methods, but negatively stained with Turnbull's blue method and melanin removal method II. Pigments found in all affected neurons were brightly autofluorescent. Electron microscopy also confirmed that the pigment granules were lipofuscin.

**Key words:** Neuronal lipofuscinosis, pathology, electron microscopy, goat

#### Bir Kıl Keçisinde Nöronal Lipofusinozis

**Özet:** Bu olgu raporunda, üç yaşlı, dişi bir kıl keçisinde görülen nöronal lipofusinozisin tanımlanması amaçlandı. Keçinin sistemik nekropsisi yapıldıktan sonra alınan doku örneklerinin kesitleri; lipofuscin pigmenti için hematoksilin-eozin (HE), periodic acid-schiff (PAS), Schmorl's ve long Ziehl-Neelsen (ZN) boyama yöntemleri ile; hemosiderin için Turnbull blue ve melanin için melanin removal method II yöntemleri ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Herhangi bir histokimyasal uygulama görmemiş preparatlar direkt olarak floresan mikroskopta; ayrıca pons ve medulla oblongata'dan alınan doku örnekleri elektron mikroskopta incelendi. Makroskopik incelemede, meninksler matlaşmış ve serebral hemisferler hafif sert kıvamlı idi. Mikroskopik incelemede, pons ve medulla oblongata'da bulunan nöronların sitoplazmalarında değişen yoğunluklarda kırmızı ya da sarı-kahve renkli pigment granülleri görüldü. Bu granüller sıklıkla perinöral yerleşimli olup, bazı nöronlarda sitoplazmanın tamamını doldurmuştu. Pigment birikimi ile birlikte meningeal ve perinöronal ödem, perivasküler kanama ve nöron dejenerasyonu belirlendi. PAS, Schmorl's ve Long ZN boyama yöntemleri ile pozitif; Turnbull blue ve melanin removal method II boyama yöntemleri ile negatif boyanma özelliği gösteren pigment granüllerinin tamamı, floresan mikroskoptaki direkt incelemede floresan pozitif yan-sımlar verdi. Elektron mikroskopik incelemede de bu pigment granüllerinin lipofuscin pigmenti olduğu doğrulandı.

**Anahtar kelimeler:** Nöronal lipofusinozis, patoloji, elektron mikroskopi, keçi

#### Introduction

Lipofuscin is primarily composed of cross-linked protein residues and is known as age related pigment due to lipid destruction in cell membranes with accumulation occurs as a result of long-term and continuous autoxidation of unsaturated lipid precursors. This pigment shows intralysosomal, perinuclear location and accumulates in cells and organs with high metabolic activity such as neurons, all muscle types, liver

and heart (Glees and Hasan, 1976; Cheville, 1983; Huxtable et al., 1987). It is not destroyed by the cell's proteolytic system, nor can it be removed from the cell by exocytosis. One of the most important features of lipofuscin is autofluorescence character in unstained sections by fluorescent microscope (Cheville, 1983). In light microscopic examinations, lipofuscin pigment shows irregular granular structures in colors ranging from golden yellow to dark brown in Hematoxylin and eosin (HE) stain (Carson and Hladik, 2009). In ultrastructural studies, it is seen as granules filled with vacuoles and lipid globules (Glees and Hasan, 1976; Cheville, 1983; Culling et al., 1985).

*Geliş Tarihi/Submission Date* : 10.04.2020

*Kabul Tarihi/Accepted Date* : 02.06.2020

\*This case report was presented as a poster at the "6. National Congress of Pathology" in Aydın-TURKEY.



In this case report, neuronal lipofuscinosis was firstly identified with pathological and electron microscopic findings in a hair goat (*Capra hircus*).

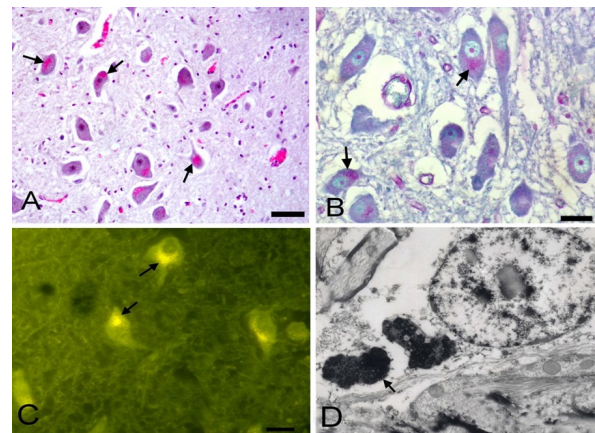
### Case

A three-year-old, female, hair goat was presented to pathology laboratory for necropsy. The systemic necropsy of animal was performed. Tissue samples taken after necropsy were fixed in 10% buffered formalin, processed routinely and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 5-6  $\mu\text{m}$  thickness and stained with hematoxylin and eosin (HE). The selected sections were stained by the periodic acid schiff stain (PAS), Schmorl's, Oil Red O, Sudan Black B and long Ziehl-Neelsen (ZN) methods for lipofuscin; Turnbull's blue method for hemosiderin and melanin removal method II for melanin (Luna, 1968; Culling et al., 1985; Carson and Hladik, 2009). Unstained deparaffinized sections were examined microscopically for fluorescence in transmitted ultraviolet light (Olympus U-LH100-3). Samples of pons and medulla oblongata taken in 1 mm also collected and processed for transmission electron microscopy investigations. These tissue samples were fixed for 48 hours in a mixture of 5% gluteraldehyde and paraformaldehyde buffered with cacodilate. Then, it was washed with 1% M cacodilate buffer (pH 7.4) and post-fixed in 2% osmium tetroxide. After being dehydrated in graded alcohols and passed through propylene oxide, it was blocked with Epon 812. Thin sections were stained with toluidine blue, and the areas selected from these sections were examined with Carl-Zeiss Em 9 S electron microscope after staining with uranyl acetate and lead citrate (Culling et al., 1985).

In the anamnesis, it was reported that the animal had difficulty in walking, and sometimes it could not displace. In addition, it was stated that tremors and convulsions, which started mildly, continued increasingly after a while. Macroscopically, the goat was in poor condition. The meninges were opaque and the cerebral hemispheres had firm consistency. No macroscopic findings were found in the visceral organs. However, it was noticed that tissues had a gelatinous appearance. In the histopathological examination, the light pink pigment granules in varying intensity and 2-10  $\mu\text{m}$  in size were observed in the cytoplasm of all neurons of pons and medulla oblongata (Figure 1A). These pigment granules were usually located perinuclearly, and they filled the entire cytoplasm in some neurons. Meningeal and perineuronal edema, perivascular hemorrhage and neuronal degeneration were prominent histopathologic findings together with pigment accumulation.

The pigment granules were stained positively with PAS (Figure 1B), Oil Red O, Sudan Black B, Schmorl's and long ZN staining methods, while they were negatively stained with Turnbull's blue method

and melanin removal method II. All of the pigment granules which showed negative staining with other staining methods gave fluorescent positive reflections in direct examination under fluorescent microscope (Figure 1C). In the electron microscopic examination, pigment granules were localized in the pericarial cytoplasm of neurons and seen as irregularly shaped electron-dense structures ranging in size from 0.5 to 2.5  $\mu\text{m}$ . Some of these structures were in the form of lobules or lamellae containing various sized vacuoles, while some of them were in the thin granular form surrounded by a membrane (Figure 1D).



**Figure 1.** Neuronal lipofuscinosis. **A.** Light pink pigment granules in the cytoplasm of neurons (arrows), pons, H&E, Bar = 30  $\mu\text{m}$  **B.** Pigment granules in the cytoplasm of neurons, pons (arrows), PAS, Bar = 30  $\mu\text{m}$  **C.** Fluorescent positive reflections under fluorescent microscope (arrows), Bar = 30  $\mu\text{m}$  **D.** Electron-dense lipofuscin granules (arrow), electron microscope Ax 16000, Bx20000

### Discussion and Conclusion

Lipofuscin pigment accumulates in different post mitotic cells like neurons and causes some neurologic disorders due to cellular dysfunction and degeneration (Baghban et al., 2013). Although neuronal lipofuscinosis has been identified in many animal species such as horses, cattle, cats and sheep (Huxtable et al., 1987; Jolly et al., 2002; Birincioğlu et al., 2005; Baghban et al., 2013), no literature information has been available regarding the occurrence in hair goats. Here, we report, to the best of our knowledge, the first case of neuronal lipofuscinosis in a hair goat.

Congenital enzyme deficiencies, toxicities, severe nutritional disorders, vitamin E deficiency, starvation due to cancer or radiation therapy and aging can be considered as the causes of accumulation of lipofuscin pigment (Huxtable et al., 1987; Birincioğlu et al., 2005; Wohlsein et al., 2013). In this presented case, it was thought that it may be related to both age of the animal and the long-term nutritional disorder in

relation to the cause of the lipofuscin pigment defined only in the central nervous system. The anamnesis and gelatinous changes observed in the adipose tissue of other organs were supported this view.

Neuronal ceroid lipofuscinosis should be considered in the differential diagnosis of neuronal lipofuscinosis. It is reported that histochemical stainings and electron microscopic examinations are the most common methods for distinguishing these two pigments (Culling et al., 1985; Nardocci and Cardona, 1998; Tammen et al., 2001; Jolly et al., 2002). Although lipofuscin pigment shows positive staining with PAS, Schmorl's, Oil Red O, Sudan Black B, Long ZN staining methods; ceroid lipofuscin pigment shows negative staining with Schmorl's staining method (Culling et al., 1985; Carson and Hladik, 2009; Birincioğlu et al., 2012). In this report, the pigment granules were stained positively with PAS, Oil Red O, Sudan Black B, Schmorl's and long ZN staining methods. Even though electron microscopic examinations show the characteristic "fingerprint" lamellar structure in the lysosomes for ceroid-lipofuscin pigment (Nardocci and Cardona, 1998), in this case, the pigment was seen in a vacuolar and lobular structure for lipofuscin pigment as reported in the literature (Glees and Hasan, 1976; Jolly et al., 1995). Moreover, negative staining was seen with Turnbull's blue method for hemosiderin and melanin removal method II for melanin.

Lipofuscin pigment accumulates cytoplasmically in cells of many organs and tissues such as central nervous system, liver, heart, kidney and intestines. This accumulation has been reported to be a yellow-brown color by many researchers in HE staining (Culling et al., 1985; Huxtable et al., 1987; Jolly et al., 2002; Birincioğlu et al., 2005; Carson and Hladik, 2009). In a case report, this pigment is stained slight eosinophilic and pale in HE method (Baghban et al., 2013). In this case, the pigment granules were stained strongly eosinophilic. This was thought to be related to the density of metals such as iron, copper, zinc, manganese and calcium bound to iron-binding proteins in the structure of the lipofuscin pigment (Jung et al., 2007).

In conclusion, in this case report, neuronal lipofuscinosis was identified with pathological and electron microscopic findings in a three-year-old hair goat.

## References

- Baghban F, Gharagozlu MJ, Bazargani TT, Samani R. Neuronal lipofuscinosis in an adult horse. *Indian J Vet Pathol* 2013; 37: 89-90.
- Birincioğlu SS, Çalış İ, Avcı H, Erdağ B. Pathological and phytochemical investigation of neuronal lipofuscinosis caused by *Asphodelus aestivus* in sheep: I. pathological findings. *Turkish J Vet Anim Sci* 2005; 29: 1351-6.
- Birincioğlu SS, Schmahl W, Avcı H. Neuronal and extraneuronal lipofuscinosis in merino sheep grazing *Asphodelus aestivus* seeds in western Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci* 2012; 36: 476-82.
- Carson FL, Hladik C. *Histotechnology, A Self-Instructional Text*. Third Edition. Hong Kong: Academic Society for Clinical Pathology Press, 2009.
- Cheville NF. *Cell Pathology*. Second Edition. Iowa: The Iowa State University Press, 1983; pp. 153-8.
- Culling CFA, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology Technique*. Fourth Edition. London: Butterworth & Co Publishers Ltd, 1985; pp. 278-88.
- Glees P, Hasan M. Lipofuscin in neuronal aging and diseases. Bargmann W, Doerr W. eds. In: *Normal and Pathological Anatomy*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers 1976; pp. 1-58.
- Huxtable CR, Chapman HM, Main DC, Vass D, Pearse BHG, Hilbert BJ. Neurological disease and lipofuscinosis in horses and sheep grazing *Trachyantha divaricata* (branched onion weed) in South Western Australia. *Aust Vet J* 1987; 64: 105-8.
- Jolly RD, Douglas BV, Davey PM, Roiri JE. Lipofuscin in bovine muscle and brain: A model for studying age pigment. *Gerontol* 1995; 41 (2): 283-95.
- Jolly RD, Arthur DG, Kay GW, Palmer DN. Neuronal ceroid-lipofuscinosis in Borderdale sheep. *NZ Vet J* 2002; 50 (5): 199-202.
- Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1119: 97-111.
- Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Edition. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1968.
- Nardocci N, Cardona F. Neuronal ceroid lipofuscinosis: A review. *Ital J Neurol Sci* 1998; 19: 271-6.
- Tammen I, Cook RW, Nicholas FW, Raadsma HW. Neuronal ceroid lipofuscinosis in Australian Merino sheep: A new animal model. *Euro J Pediatr Neurol* 2001; 5 (Suppl A): 37-41.
- Wohlsein P, Deschl U, Baumgartner W. Non lesions, unusual cell types and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. *Vet Pathol* 2013; 50 (1): 122-43.





## Nadir Bir Olgu Sunumu: Bir Van Kedisinde Prolapsus Uteri

Yunus Emre ATAY, Yaşar AKAR

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

**Sorumlu yazar:** Yaşar AKAR; E-posta: yasarakar@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0002-0205-493X

**Atıf yapmak için:** Atay YE, Akar Y. Nadir bir olgu sunumu: Bir Van kedisinde prolapsus uteri. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 18(1): 60-63

**Özet:** Üç yaşında, 2.7 kg ağırlığında, ilk doğumunu yapan, canlı ilk yavrusunu evde doğurduktan 8 saat sonra vulva dudakları arasından dışarı gelen yaklaşık 2 cm eninde 4 cm uzunluğunda koyu kahverengi tonlarında bir kitlesi olan Van kedisi Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesine getirildi. Kedinin klinik muayenesi yapıldı ve prolapsus uteri tanısı konuldu. Kedinin kan kalsiyum değerinin düşük olduğu (6.6 mg/dl) ve bunun uterus atonisi oluşturarak prolapsus uteriye sebep olabileceği değerlendirildi. Transabdominal ultrasonografi muayenesinde, prolabe olmayan kornu uteride kalp atımları olan iki yavru görüldü. Prolabe olan sağ kornu uterinin ödemi azaltıldıktan sonra vajina boşluğuna ret edildi. Daha sonra kedi gaz anestezisi altında operasyona alındı. Öncelikle sol kornu uteriye yapılan kesiyile biri canlı diğeri ölü (ölüm muhtemelen operasyon sürecinde oldu) olan yavrular alındı. Daha sonra prolabe olan sağ kornu uteri ucundan nazikçe çekilerek eversiyonu düzeltildi. Müteakiben ovariohisterektomi operasyonu yapıldı. 10 gün sonra hayvan sahibi aranarak, anne ile yavrularının sağlıklı olduğu öğrenildi. Canlı bir yavru doğurduktan sonra bir kornu uterisi prolabe ve diğeri kornu uterisi normal (içerisinde canlı iki yavru olan) konumda olan bir Van kedisi güç doğum vakası kliniğimizde ilk defa görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Canlı yavru, güç doğum, prolapsus uteri, van kedisi

### A Rare Case Report: Uterine Prolapse in a Van Cat

**Summary:** A 3-year old primipara Van cat weighing 2.7 kg, which had given a live fetus birth eight hours at home before being brought to our clinic at Erciyes University, Faculty of Veterinary Science, Education, Research and Practice Hospital, with a dark brown mass of about 2 cm width and 4 cm in length coming out of the vulva lips. The cat was examined clinically and diagnosed as uterine prolapse. It was evaluated that the cat's blood calcium level was low (6.6 mg/dl), probably causing uterine atony and uterine prolapse. In transabdominal ultrasonography examination, two pups with heart beats in the left corn uterus without prolapse were seen. After edema was reduced on the prolapsed right corn uterine, it was rejected into the vagina cavity. Immediately later, the cat was operated on under gas anesthesia. First of all, the offspring, one alive and the other dead (probably died during operation) were taken with the left corn incision. Then the eversion was corrected by pulling the prolapsed right corn uterus tip gently. Subsequently, an ovariohysterectomy operation was performed. After 10 days, the animal owner was called and it was learned that the mother and her offspring were healthy. After giving birth to a live fetus, the Van cat dystocia case with a corn uterine prolapse and the other corn uterine in the normal position (two live kittens inside) was seen in our clinic for the first time.

**Key words:** Dystocia, live kitten, uterine prolapse, van cat

### Giriş

Prolapsus uteri evcil kedilerde nadir görülen bir olgudur (Deroy ve ark., 2015; Macintare, 1994; Yıldız ve Akar, 2013). Kornulardan birinin veya her ikisinin birlikte prolabe olduğu (Biddle ve Macintare, 2000; Macintare, 1994; Uçmak ve ark., 2018), hem primipar hem de multipar kedilerde görüldüğü (Nöthling ve ark., 2002), normal doğum esnasında, abort sonrasında (Macintare, 1994) veya doğumdan sonraki 48 saat içerisinde, uzayan doğum sürecinde (Nöthling ve ark., 2002; Sabuncu ve ark., 2017), genellikle serviks dilate olduğu zaman şekillendiği bildirilmiştir (Biddle ve Macintare, 2000; Jutkowitz 2005; Sabuncu ve ark., 2017). Sebebi tam olarak bilinmemekle birlik-

te şiddetli ıkınma, pelvik kasların aşırı gevşemesi, uterus atonisi, çoğul gebelikler, östrojen fazlalığı, kalıtsal yatkınlık, uterus travması, yavru zarlarının atılamaması ve ovaryumu asan ligamentlerin gevşek olması kedilerde prolapsus uterinin sebepleri arasında yer alır (Jutkowitz, 2005; Nöthling ve ark., 2002; Özyurtlu ve Kaya, 2005; Sabuncu ve ark., 2017; Yıldız ve Akar, 2013).

Anamnez ve klinik muayenede, uterusun vulva dudakları arasından dışarıya sarkmış vaziyette görülmesi kesin teşhis için yeterlidir (Nelissen, 2016). Prolapsus sonrası 6-48 saat içerisinde iştahsızlık, depresyon ve şok belirtileri görülebilir. Takibinde idrar yapma gücünün, ıkınma, ağrı, bölgesel dolaşımda bozulma ve enfeksiyon oluşabilir. Kitle üzerinde yavru zarları ve dışkı atıkları bulunabilir (Yıldız ve Akar,

2013). Vagina, uterus ve uretra tümörleri, retensiyon sekondinarum ve prolapsus vagina ile karıştırılmamalıdır (Nelissen, 2016).

Prolabe olan uterus dokusu farklı düzeylerde hemorajik, konjestif, ödematöz, ülseratif hatta nekrotik olabilir (Biddle ve Macintare, 2000; Derooy ve ark.,

Prolabe dokuda hiperemi, ödem ve mukozada yer yer eroziv ve ülseratif alanlar görüldü. Kedinin genel durumu iyi, vücut sıcaklığı, solunum ve nabız sayıları normal sınırlar içerisindeydi. Kan biyokimyasal parametreleri içinde kreatin, kalsiyum ve total protein değerleri biraz düşüktü (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kedinin bazı biyokimyasal değerleri

Parametreler	Ölçülen değer	Referans aralık
BUN	28.0 mg/dl	17.6-32.8
CRE	<b>0.6 mg/dl</b>	0.8-1.8
ALP	32 U/l	9-53
GPT	30 U/l	22-84
Ca	<b>6.6 mg/dl</b>	8.8-11.9
GLU	103 mg/dl	71-148
TP	<b>4.0 g/dl</b>	5.7-7.8

2015; Jutkowitz 2005; Nelissen, 2016; Sabuncu ve ark., 2017). Uterus rupturu, uterus enfeksiyonu, damarların yırtılması ve kanama ile komplike olabilir. Şiddetli vakalarda, hayvanda şok veya toksemi tablosu görülebilir (Nelissen, 2016).

Olgunun karakteristiğine göre farklı tedavi yöntemleri izlenmelidir. Bunlar prolabe dokunun elle reddi, laparotomi ile dokunun düzeltilmesi, ovariyohisterektomi (Biddle ve Macintare, 2000) ve prolabe dokunun amputasyonudur (Jutkowitz, 2005).

### Olgu

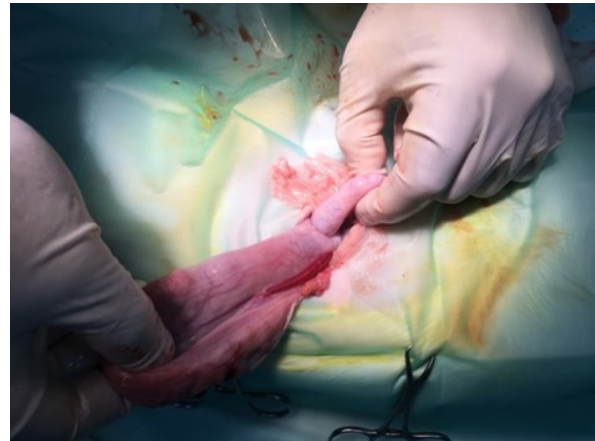
Bu olgunun materyalini, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesine getirilen 3 yaşında, 2,7 kg ağırlığında, primipar bir Van kedisi oluşturdu. Sağlıklı canlı bir yavru doğumu gerçekleştiren kedi, 8 saat sonra perineal bölgesinde anormal bir kitle görülmesi üzerine hayvan sahibi tarafından hastanemize getirildi.

Yapılan klinik muayenede tek taraflı kısmi prolapsus uteri teşhisi konuldu (Şekil 1).



**Şekil 1.** Kedinin unilateral prolapsus uteri görüntüsü

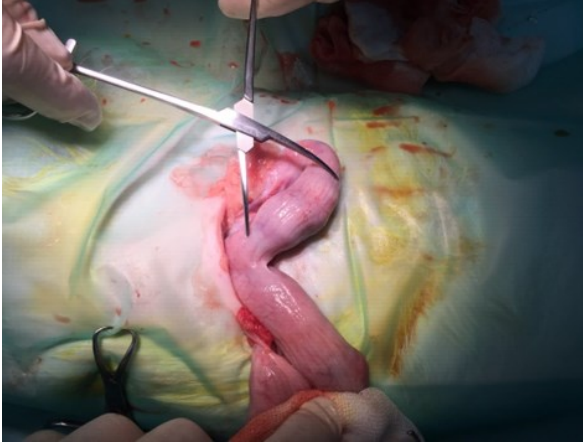
Doğuma bağlı abdominal ıkmaların şekillenmediği gözlemlendi. Ultrasonografi muayenesinde karın boşluğu içinde yer alan kornu uteride kalp atımı olan 2 yavru görüldü. Prolabe uterus dokusu hafif antiseptikli su ile temizlendi, % 30'luk dekstroz solüsyonu ve soğuk kompresle uterusun ödemi azaltıldıktan sonra vajina boşluğuna reddi sağlandı. Takiben sezaryen operasyonu yapıldı. Anestezi süresince kalp atım hızında, izotonik NaCl damar içi yolla verildi. Kedinin anestezi-sinde; başlangıçta atropin sülfat (Vetaş Atropin %0.2, Vetaş) 30 µg/kg deri altı, medetomidin (Domitor®, Zoetis) 80 µg/kg kas içi, takiben sevofluran (Sevorane® %100, AbbVie) %3 inhalasyon şeklinde kullanıldı. Sol fossa paralumbalis bölgesinden yapılan ensizyonla önce yavruların bulunduğu sol kornu uteri dışarı alındı, kesiden yavrular alındı ve sağ kornu uterinin eversiyonu görüldü (Şekil 2).



**Şekil 2.** Laparotomide sol kornu kesisinden yavruların alınması ve bifurkasyon bölgesinde sağ kornu uterinin eversiyon görüntüsü

Uterustan alınan yavrulardan birinin canlı, diğerinin ise ölü olduğu belirlendi. Vajina boşluğunda bulunan prolabe uterus, karın boşluğundaki kornunun uç kısmından nazikçe çekilerek normal konumuna getirildi.

Eversiyonu düzeltilen sağ kornu uterusun bifurkasyo bölgesine yakın olan 1/3'lük kısmı olduğu gözlemlendi (Şekil 3). Ardından rutin ovaryohistektomi prosedü-



**Şekil 3.** Eversiyonu düzeltilen sağ kornu uteri (hemostatik pens uçları arası) görüntüsü

rü uygulandı. Postoperatif atimapezole (Antisedan®, Zoetis) 200 µg/ kg kas içi ve amoksisilin+klavulanik asit (Synulox, Zoetis) 8.75 mg/kg dozda 5 gün süreyle günde 1 defa uygulandı. Kedi canlı 2 yavrusu ile birlikte hastanemizden taburcu edildi. Bu olgu, Van kedisinde prolapsus uteri ile seyir eden bir ilk güç doğum vakasıdır.

### Tartışma ve Sonuç

Prolapsus uteri genellikle doğum sonrası ilk 48 saat içerisinde oluşmaktadır (Kutzler, 2018; Sabuncu ve ark., 2017; Valentine ve ark., 2016). Sabuncu ve ark. (2017), bir kedide doğumdan 72 saat sonra şekillendiğini bildirmiştir. Gebe olmayan bir kedide ise diffuz, polipoid, fibröz perimetritis ve parametritis ile ilişkili olarak şekillendiği de bildirilmiştir (Valentine ve ark., 2016). Prolapsus uteri genellikle kısmi veya tam eversiyon şeklinde görülebilir. Fakat uterus eversiyon olmaksızın servikal bölgede şekillenen bir yırtıktan uterusun prolabe olduğu da bildirilmiştir (Bigliardi ve ark., 2014). İç organların (bağırsak, idrar kesesi) uterus içerisine inkarsere olması söz konusu olabilir (Jarolmasjed, 2017).

Prolabe doku içerisinde abdominal organların olup olmadığını kontrol etmek için palpasyon ve ultrasonografi yapılmalıdır. Abdominal ultrasonografiyle idrar kesesi, bağırsakların pozisyonu ve başka yavruların olup olmadığını belirlemek önemlidir. Prognoz; vakanın üzerinden geçen zamana, tedavinin doğru planlanmasına ve komplikasyonların erken fark edilmesine bağlıdır (Deroy ve ark., 2015).

Prolabe dokunun vagina içerisinde olduğu kısmi prolapsus olgularında parmak palpasyonu ve vaginoskopi ile teşhis konulabilir. Hayvanın huzursuzluğu, vaginal akıntı, ıkınmanın şiddeti ve sıklığı, geçmiş doğu-

muna ilişkin anamnez bilgileri iyi değerlendirilmelidir (Nelissen, 2016).

Tedavinin amacı uterusu normal pozisyonuna getirmektir. Bunun uygulanması prolapsusun şiddeti ve kronikleşmesi, uterus dokusunun vaziyeti ve hastanın genel durumuna bağlıdır. Tedavi sürecinde prolabe doku temizlenmeli ve korunmalıdır (Jutkowitz, 2005; Kutzler, 2018). Şok veya toksemi varlığında uterusu girişim yapmadan önce mutlaka hayvanın durumu stabil hale getirilmelidir (Nelissen, 2016).

Prolabe dokuda şiddetli bir yaralanma veya nekroz yoksa dokunun reddi endikedir. Böyle bir girişim için anestezi veya epidural analjeziye ihtiyaç vardır (Biddle ve Macintare, 2000). Hipertonik solüsyonların durumu iyi olmalıdır ve uterusu başka bir yavrunun olmadığı tespit edilmelidir (Jutkowitz, 2005). Doku tamamıyla hafif antiseptikli solüsyonlarla temizlenmelidir. Ödem varsa dokunun küçültülmesi için % 50 dekstroz gibi hipertonik solüsyonlar kullanılabilir ve ret işlemi öncesi uterus iyice kayganlaştırılmalıdır (Biddle ve Macintare, 2000). Hipertonik solüsyonların faydasının sınırlı olduğu da bildirilmektedir. Dokunun eski konumuna getirilmesi için steril svab gibi silindirik araçlar kullanılabilir (Kutzler, 2018). Uterusun reddine kolaylık sağlamak için episyotomi operasyonu gerekebilir. Bu müdahaleler nedeniyle sistemik antibiyotik kullanılmalıdır (Jutkowitz, 2005; Kutzler, 2018). Uterusun vulva-vagina yoluyla ret edilmesi mümkün değilse laparotomi yapılarak düzeltilmesi düşünülebilir (Biddle ve Macintare, 2000; Kutzler, 2018; Macintare, 1994). Laparotomiyle uterus eversiyonun tam düzeltilmesinin ardından genelde nüks şekillenmez (Macintare, 1994), ancak tedbiren nüksü önlemek için uterus ventrolateral karın duvarına sabitlenebilir (Jutkowitz, 2005) ve 5-10 IU oksitosin kas içi kullanılabilir (Macintare, 1994). Prolapsusun süresine bağlı olarak doku işlemik veya nekrotik ise ovaryohistektomi endikedir. Uterus veya ovaryum arterinde kanama ile komplike bir durum varsa stabilizasyonun sağlanmak için sıvı sağaltımı, kan nakli ve oksitosin yapılır. Bu uygulamalarla, kanama kontrol altına alınmazsa ovaryohistektomi yapılmalıdır (Biddle ve Macintare, 2000; Jutkowitz, 2005; Macintare, 1994). Prolabe uterus dokusundaki ciddi ödem, şişkinlik, nekroz nedeniyle doku elle ret edilemez veya laparotomi ile normal anatomik pozisyonuna getirilmezse, uretra kateterize edilerek prolabe dokunun ampute edilmesi sonrasında geriye kalan uterus ve ovaryumlar da cerrahi olarak uzaklaştırılır (Jutkowitz, 2005; Macintare, 1994).

Kedilerde prolapsus uteri nadiren görülmekle birlikte prognoz açısından acil müdahalesi gereken bir durumdur. Olası komplikasyonlar göz önünde bulundurularak, kapsamlı muayeneler neticesinde tedavi protokolü hızlıca planlanmalı ve vakit kaybetmeden uygulanmalıdır. Sonuç olarak; vakamızda kısmen prolabe olan uterus başarılı bir şekilde vajina boşluğuna ret edildi. Operasyonla iki yavru alındıktan sonra

ovaryohisterektomi prosedürü uygulanarak tamamlanmıştır. Canlı bir yavruyu doğurduktan 8 saat sonra kısmi prolapsus uteri ile komplike olmuş bir Van kedisi güç doğum vakası kliniğimizde ilk defa görülmüştür.

#### Kaynaklar

Biddle DW, Macintire DK. Obstetrical emergencies. Clin Tech Small Anim Pract 2000;15(2): 88-93.

Bigliardi E, Di Ianni F, Parmigiani E, Cantoni AM, Bresciani C. Complete uterine prolapse without uterine mucosal eversion in a queen. J Small Anim Pract 2014; 55(4): 235-7.

Deroy C, Bismuth C, Carozzo C. Management of a complete uterine prolapse in a cat. JFMS Open Rep 2015; 1(1): 1-4.

Jarolmasjed S. Unusual case of utero-ovarian prolapse concurrent with cystocele in a queen. Iran J Vet Surg 2017; 12(1): 69-73.

Jutkowitz LA. Reproductive emergencies. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2005; 35(2): 397-420.

Kutzler MA. Uterine and vaginal prolapse. Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski EA, Silverstein DC. eds. In: Textbook of Small Animal Emergency Medicine. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2018; pp. 807-11.

Macintire DK. Emergencies of the female reproductive tract. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1994; 24(6): 1173-88.

Nelissen P. Uterine and vaginal prolapse. Aronson LR. ed. In: Small Animal Surgical Emergencies, Hoboken NJ: John Wiley & Sons 2015; pp. 420-28.

Nöthling JO, Knesl O, Irons P, Lane E. Uterine prolapse with an interesting vascular anomaly in a cheetah: a case report. Theriogenology 2002; 58 (9): 1705-12.

Özyurtlu N, Kaya D. Unilateral uterine prolapse in a cat. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29(3): 941-3.

Sabuncu A, Dal GE, Enginler SÖ, Karacam E, Toydemir TSF, Ucmak M. Feline unilateral uterine prolapse: a description of two cases. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2017; 43(1): 67-70.

Uçmak ZG, Ucmak M, Cetin AC, Tek Ç. Uterine prolapse in a pregnant cat. Turk J Vet Anim Sci 2018; 42(5): 500-2.

Valentine MJ, Porter S, Chapwanya A, Callanan JJ. Uterine prolapse with endometrial eversion in association with an unusual diffuse, polypoid, fibro-

sing perimetritis and parametritis in a cat. JFMS Open Rep 2016; 2(1): 1-4.

Yıldız H, Akar Y. Puerperal dönem fizyolojisi ve sorunları. Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. eds. In: Köpek ve Kedilerde Doğum ve Jinekoloji. Birinci Baskı. Malatya: Medipres Yayıncılık, 2013; s.423-34.

## Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, [ercvet@gmail.com](mailto:ercvet@gmail.com) adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlamalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
14. Ondalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. Kaynaklar metin içinde cümle sonunda belirtilmelidir. Yazar soy isimleri ve tarihi yazı içinde her kaynağa ait yayın yılı yazar isminden hemen sonra parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak iki isimli ise isimler belirtilmeli (örn; Kaldhone ve Nayak, 2008). Kaynakta yazar sayısı ikiden fazla ise sorumlu yazar "ve ark." şeklinde belirtilmelidir (örn, Kaldhone ve ark., 2008). Eğer kaynak cümlenin başında kullanılıyorsa yazar isimlerinden sonra parantez içinde yayın yılı belirtilmelidir.
19. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, kaynaklar bölümünde 0.5 cm içeri doğru asılı halde yazılmalıdır. Noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**  
Kaynaklar;  
19.1. Kaynak süreli yayın ise;  
Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.  
19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;  
Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Krusibeek AM, Marguiles DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.  
19.3. Kaynak kitap ise;  
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.  
19.4. Kaynak editörlü kitap ise;  
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafli KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.  
19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;  
Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.  
19.6. Kaynak tez ise;  
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.  
19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;  
Örnek: TÜİK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.  
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.  
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**



## Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references.
4. Manuscripts should be sent to [ercvet@gmail.com](mailto:ercvet@gmail.com). For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 words) with no paragraph and not more than five Key words in Turkish and English. Key words must be placed below summary with an alphabetical order (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be specified in the text at the end of the sentence. Author surnames and the date of publication should be specified in parentheses. If the reference has two names, the names should be given after the publication year (eg, Kaldhone and Nayak, 2008). If the reference has more than two names should be given as "et al.," (eg, Kaldhone et al., 2008). If the source is used at the beginning of the sentence, the year of publication should be specified in parentheses after the names of the authors.
19. References should be placed in alphabetical order and hanging 0.5 cm inwards in the references section. Punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.** References;
  - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;  
Example: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaide DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
  - 19.2. If the reference is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below;  
Example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Margulies DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
  - 19.3. If the reference is a book, citation must be done as shown below;  
Example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
  - 19.4. If the reference is whole book with an editor, citation must be as below;  
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
  - 19.5. If the reference is from meeting, citation must be done as shown below;  
Example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; Izmir-Türkiye.
  - 19.6. If the reference is from a thesis, citation must be done as shown below;  
Example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, Izmir-Turkey, 1993.
  - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;  
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tujk.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

---

**TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF**  
**VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY**

---

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research    (...) Derleme / Review    (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report    (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....  
.....  
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
  - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
  - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
  - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

**Not/Note:** Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

---

**Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University**  
**Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE**  
**Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com**

---

## SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

## FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.