



# Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

## *Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association*

e-ISSN: 2667-8381



Cilt (Volume): 12 - Sayı (Issue): 1 - 2021  
<https://dergipark.org.tr/vetfarmatoksbulten>



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

**Baş Editör / Editor-in-Chief**

Prof.Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)



**Editörler Kurulu / Editorial Board**

Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr.Begüm YURDAKÖK DİKMEN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ (Kırıkkale Üniversitesi, Türkiye)  
Dr. Sedat SEVİN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuzmayıs Üniversitesi)	Prof.Dr. Cavit KUM (Adnan Menderes Üniversitesi)
Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi)	Prof.Dr. Aneliya MILANOVA (Trakya Üniversitesi, Bulgaristan)
Prof.Dr. Nuri ALTUĞ (Namık Kemal Üniversitesi)	Prof.Dr. Songül SONAL (Uludağ Üniversitesi)
Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. İbrahim TAŞAL (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)
Prof.Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ (Selçuk Üniversitesi)
Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr.Murat YILDIRIM (İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi)
Prof.Dr. İbrahim DEMİRKAN (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. Ali Cesur ONMAZ (Erciyes Üniversitesi)
Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY (Ankara Üniversitesi)	Dr. Ishraga G. IBRAHİM (Central Veterinary Res Lab, Sudan)
Prof.Dr. Gökhan ERASLAN (Erciyes Üniversitesi)	Dr. Shahram SAGHAEI (Orumieh Azad Üniversitesi, İran)
Prof.Dr. İzzet KARAHAN (Balıkesir Üniversitesi)	Dr. Tomaž SNOJ (Ljubljana Üniversitesi, Slovenya)





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association



**İmtiyaz Sahibi :** Prof.Dr. Ender YARSAN

**Yazı İşleri Müdürü :** Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ

**Dernek Yazışma Adresi :** Atmaca Sokak No: 8/3 06110, Dışkapı- Ankara

**Tasarım :** Makromedya Halkla İlişkiler Ltd. Şti.

**Dizgi :** Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ

Bültenin amacı, bilimsel etik kuralları çerçevesinde, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ile ilgili ulusal- uluslararası literatüre katkıda bulunacak derleme türünde çalışmalarını yayınlamaktır. Yılda üç kez yayınlanan kör hakemli bir açık erişim bültenidir. Bültenin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir. Alınan tüm yazılar intihal kontrol yazılımları (iThenticate veya Turnitin programı) ile kontrol edilmektedir .

Bültenimiz 2019 yılı Cilt 10, Sayı 1'den itibaren ResearchBib (Academic Research Index), ESJI(Eurasian Scientific Journal Index), ROOTINDEXING, Google Scholar, Sindex (Scientific Indexing Services) , 2020 yılı Cilt 11, Sayı 1'den itibaren de ASOS İndeks, Türkiye Atıf Dizini ve Index Copernicus indeksleri tarafından taranmaktadır. Bültenimizde yayınlanacak makalelere Cilt: 11, Sayı: 1'den itibaren DOI numarası verilmektedir.

Her Hakkı Saklıdır. Bültende yer alan yazılar kaynak gösterilerek alıntı yapılabilir. Yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

İletişim: [vftdbulden@vetfarmatoks.org.tr](mailto:vftdbulden@vetfarmatoks.org.tr)





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Cilt: 12 - Sayı: 1- 2021

---

1. BİLİMSEL ARAŞTIRMALARDA MİKRODİYALİZ TEKNİĞİ <i>MICRODIALYSIS TECHNIQUE IN SCIENTIFIC RESEARCHES</i> Zeyno NUHOĞLU, Abdurrahman AKSOY.....	1
2. TAMAMLAYICI-GELENEKSEL TIP KAPSAMINDA FİTOTERAPİ VE KANSER YAKLAŞIMI <i>PHYTOTHERAPY AND CANCER APPROACH IN COMPLEMENTARY- TRADITIONAL MEDICINE</i> İsmail KURHAN, Hüsamettin EKİCİ.....	15
3. SİTOKİNLER VE KANATLILARDA SİTOKİNLERİN AŞI ADJUVANTI OLARAK KULLANIMI <i>CYTOKINES AND THE USE OF CYTOKINES AS VACCINE ADJUVANT IN POULTRY</i> Aziz Utku ÖNEL, Murat YILDIRIM.....	21
4. KANATLI KORONA VİRÜSLERİNİN ZONOTİK POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ <i>EVALUATION OF THE ZONOTIC POTENTIAL OF AVIAN CORONA VIRUSES</i> Akın ÜNAL, Hakan YARDIMCI.....	33
5. RUMİNANTLARDA METAN SALINIMINI AZALTMA STRATEJİLERİ <i>METHANE MITIGATION STRATEGIES IN RUMINANTS</i> Gürsel GÜR, Hakan ÖZTÜRK.....	43



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 1-14, 2021  
DOI: 10.38137/vftd.864222

## BİLİMSEL ARAŞTIRMALARDA MİKRODİYALİZ TEKNİĞİ

Zeyno NUHOĞLU<sup>1a</sup>, Abdurrahman AKSOY<sup>1b</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0002-1080-2926, ORCID<sup>b</sup>: 0000-0001-9486-312X

\*Sorumlu Yazar: Zeyno NUHOĞLU  
E-Posta: nuhogluzeyno@gmail.com

Geliş Tarihi: 19.01.2021  
Kabul Tarihi: 22.02.2021

### ÖZET

Mikrodiyaliz (MD), doku ve organlardaki fizyolojik ve kimyasal maddeleri belirlemek için hem hayvan hem de insanlarda kullanılan *in vivo* biyoanalitik örnekleme yöntemidir. “Mikro” son derece küçük ölçeği, “diyaliz” ise kimyasalların yarı geçirgen bir zar üzerindeki hareketini ifade eder. MD, kimyasal olayların sistemik kan seviyelerinde değişiklikler yaratmadan önce dokularda neler olup bittiğinin bir ön izlemesini sunar. Bu yöntem, ilk kez 1950’li yılların sonunda hayvan beynindeki endojen bileşikler incelemek için tasarlanmış; yıllar içerisinde diğer organlarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. *In vivo* olan bu yöntemde; hemen hemen her doku, organ veya biyolojik sıvıdan elde edilen mikrodiyaliz örnekleme, hücre dışı sıvının bileşimini yansıtmaktadır. Özel olarak tasarlanmış probalar kullanılarak, bağlı olmayan analitler sürekli olarak örneklenir. Bu analitler, biyokimyasal işlevlerini değerlendirmek için örneklenen endojen molekülleri (nörotransmitter, hormon, glikoz) veya bu moleküllerin biyolojik sistem içindeki dağılımlarını belirlemek için örneklenen ekzojen bileşikler (farmasötikler) içerebilir. Ekzojen bileşiklerin lokal etkileri; merkezi sinir sistemi, hepatik doku, dermis, kalp düzeyinde mikrodiyaliz yoluyla incelenebilmektedir. Ayrıca, MD merkezi sinir sistemi çalışmalarında, antidepresan, antipsikotik, antiparkinson, halüsinojen, bağımlılık yapıcı maddeler ve deneysel ilaçlar gibi farklı farmakolojik ve toksikolojik maddelerin nörotransmisyon üzerindeki etkilerin araştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. MD, çok yönlü olmasından dolayı biyomedikal araştırmalar da dahil olmak üzere günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu derlemenin amacı, mikrodiyaliz; temel prensiplerini tanımlamak, uygulama alanlarını belirtmek, avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymak, klinik farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarındaki önemini vurgulamaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Ekstrasellüler sıvı, farmakoloji, mikrodiyaliz, örnekleme yöntemi, toksikoloji.

### MICRODIALYSIS TECHNIQUE IN SCIENTIFIC RESEARCHES

#### ABSTRACT

Microdialysis (MD) is an *in vivo* bioanalytical sampling method used in both animals and humans to determine physiological and chemical substances in tissues and organs. “Micro” refers to the extremely small scale and “dialysis” refers to the movement of chemicals across a permeable membrane. MD provides a preview of what goes on in tissues, before chemical events can be reflected as changes in systemic blood levels. This method was designed for the first time in the late 1950s to study endogenous compounds in the animal brain. It has been developed for use in other organs over the years. In this *in vivo* method, sampling from almost any tissue, organ or biological fluid reflects the composition of the extracellular fluid. Using specially designed probes, unbound analytes are continuously sampled continuously. These may include endogenous molecules (e.g. neurotransmitters, hormones, glucose) sampled to assess their biochemical functions or exogenous compounds (e.g. pharmaceuticals) sampled to determine their distribution within the animal. Local effects of exogenous compounds have been studied in the central nervous system, hepatic tissue, dermis, heart and corpora lutea of experimental animals by means of microdialysis. Furthermore in central nervous studies, this technique has been extensively used for the study of the effects on neurotransmission at different central nuclei of diverse pharmacological and toxicological agents, such as antidepressants, antipsychotics, antiparkinsonians, hallucinogens, drugs of abuse and experimental drugs. MD is widely used today in many fields including biomedical research. The aim of this review is to define the basic principles of microdialysis, to indicate its application areas to reveal its advantages and disadvantages and to emphasize its importance in clinical pharmacology and toxicology research.

**Keywords:** Extracellular fluid, microdialysis pharmacology, sampling method, toxicology.

## GİRİŞ

Tıbbi uygulamalardaki birçok tanı ve tedavi kararı, endojen moleküllerin kan konsantrasyonlarını ölçmeye dayanır. Ancak, biyokimyasal ve farmakolojik olaylar genellikle dokularda gerçekleşir. Doku kimyasının değerlendirilmesi teorik olarak daha doğru veriler sağlamaktadır. Bu değerlendirme, mikrodializ yöntemiyle ucuz ve minimal invaziv olarak gerçekleştirilir (Joukhadar ve ark., 2001; Lönnroth, 1991). Mikrodializ (MD), vücudun doku ve organlarına bağlanmamış sıvı konsantrasyonlarını ölçmek için biyomedikal çalışmalarda kullanılan; minimal invaziv bir örnekleme tekniğidir (De la Peña ve ark., 2000). MD, belirlenen bir bölgedeki maddeleri toplamak veya bu maddeleri bölgeye vermek için kullanılır. Bu yöntem, ilk kez hayvan beynindeki endojen bileşiklerin konsantrasyonlarını ölçmek için 1950'lerin sonlarında tasarlanmıştır. Daha sonraki yıllarda mikrodializ çeşitli dokulardaki hücre dışı sıvıda, endojen ve ekzojen bileşikleri araştırmak üzere yeniden geliştirilmiştir. Bu gelişmeler, 1990'lı yılların başında çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiş ve mikrodializ bugünkü halini almıştır (Hammarlund-Udenaes, 2017). MD tekniği, *in vitro* çalışmalarda örnekleme için kullanılmasının yanında *in vivo* çalışmalarda da önemli bir yere sahiptir. Çok yönlülüğü nedeniyle, MD çeşitli alanlarda; özellikle farmakoloji, nörolojik bilimler ve biyomedikal araştırmalarda son yıllarda kullanılan oldukça popüler bir tekniktir (Kho ve ark., 2017; Ungerstedt, 1991). MD' de temel ilke, dokuya implante edilmiş ince bir dializ tüpünü fizyolojik bir sıvı ile perfüze ederek kılcal kan damarının işlevini taklit etmektir. Perfüze, maddelerin zar üzerinde ileri geri difüzyonuna bağlı olarak hücre dışı sıvısının bileşimini yansıtır. Mikrodializin en önemli özelliği, tüm kan kimyasının kaynağı olan hücre dışı sıvısının örneklenmesine izin vermesidir. Ayrıca, MD

büyük molekülleri perfüzeattan hariç tutarak kimyasal analizi kolaylaştırır. Bu teknik, nörotransmitter salınımını izlemek için nörolojik bilimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (De la Peña ve ark., 2000). MD, ilaç ve metabolitlerin kan beyin bariyeri ve diğer organ bariyerlerindeki aktif taşıma mekanizmasının anlaşılmasında da önemli katkılar sağlamıştır (Hammarlund-Udenaes, 2017).

Bu derlemede mikrodializin; temel prensipleri, avantaj ve dezavantajları, yöntemin bilimsel araştırmalarda uygulanması, gelecek yıllardaki durumunun değerlendirilmesi sunulmaktadır. Ayrıca, MD'in çok yönlü uygulama alanları, güncel literatürlerle desteklenerek ortaya konulmaktadır.

## MİKRODİYALİZİN TEMEL PRENSİPLERİ

### Mikrodializ Tekniği ile İlgili Genel Bilgiler

Mikrodializ çalışmaları, 1950'li yılların sonunda beyinde nörotransmitter seviyelerinin ölçülmesiyle başlamıştır. Bu çalışmalar, günümüzdeki mikrodializ çalışmalarının da yapı taşı olmuştur. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar, mikrodializ ile ilgili yayınların %24'ünü oluşturmaktadır. Bu yayınların %72'si beyin ile ilişkiliyken, geri kalanı perifer organlardaki MD çalışmalarına dayanmaktadır (Hammarlund-Udenaes, 2017). *In vivo* mikrodializ, interstisyel (hücreler arası) doku sıvısının kimyasal bileşimini; yani hücrelerin ve diğer hedef yapıların (doku ve organların) doğrudan maruz kaldığı sıvıyı ölçer. MD, görüntüleme teknikleri veya biyosensörlerin aksine, örnekleme aracı olduğundan analitik bir cihaza gereksinim duyar. İnterstisyel sıvıdaki hemen hemen her çözünür molekül uygun bir analiz yöntemiyle birleştirildiğinde, mikrodializ ile ölçülebilmektedir. Bu yöntem, ilk kez 1972'de Delgado ve ark. tarafından prelinik farmakokinetik çalışmalara dahil edilmiştir (Joukhadar ve ark., 2001). Ancak,



insanlarda yapılan bu çalışmalar 1987'de yayımlanabilmiştir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodiyaliz klinik öncesi değerlendirme ve validasyondan, klinik uygulamaya kadarki aşamalarda kullanılan önemli bir teknik olarak farmakoloji çalışmalarında yer almaktadır. Bu yöntemde, analiz için yalnızca birkaç mikro litre sıvıya ihtiyaç vardır. Ayrıca, yöntem son derece hassas kimyasal detektörlerin geliştirilmesiyle yaygınlaşmaktadır (Müller, 2002). Klinik farmakokinetik çalışmalar, MD ile intersitisyel sıvıdaki çözünen maddelerin konsantrasyon-zaman profilleri hakkında bilgi sağlamayı amaçlamaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilerin doğruluğu mikrodiyaliz problemlerinin uygun kalibrasyon yöntemlerine duyulan ihtiyacı vurgulamıştır. Bu nedenle, mikrodiyaliz problemlerinin *in vivo* kalibrasyonu klinik farmakokinetik çalışmalarda önemli bir konu haline gelmiştir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodiyaliz sürekli bir örnekleme yöntemi olduğundan, kan örnekleme gibi nokta örnekleme yöntemlerinden farklıdır. Dokularda lokal ölçümler elde etme yeteneği sayesinde mikrodiyaliz; farmakokinetik, farmakodinamik, patoloji ve patofizyoloji alanlarında doku değişikliklerinin saptanmasında önemli keşiflere yol açmıştır (Shippenberg ve Thompson, 1997).

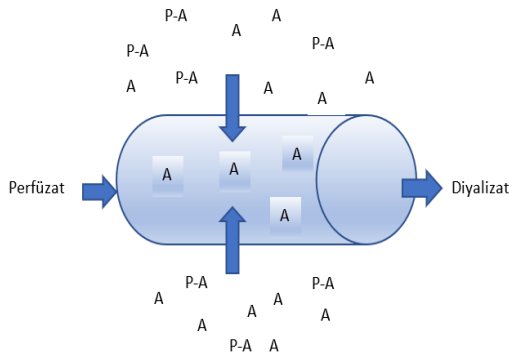


**Şekil 1.** Mikrodiyaliz ile İlişkili Önemli Noktalar (Müller, 2000, 2002; Shippenberg ve Thompson, 1997).

### Mikrodiyaliz Tekniğinin Unsurları

Mikrodiyaliz, bir probun ucundaki yarı geçirgen zar vasıtasıyla, interstisyel sıvıdan çözünür moleküllerin örneklenmesine dayanır. Mikrodiyaliz sistemi; mikrodiyaliz pompası, prob olarak da adlandırılan mikrodiyaliz kateteri ve numunenin (diyalizat) toplandığı bir mikroviyalden oluşur. Mikrodiyaliz işlemi sırasında prob dokuya veya diğer matrislere implante edilir (Chaurasia, 1999; Plock ve Kloft, 2005). Tüm mikrodiyaliz problemleri, genellikle ilgili analitten yoksun fizyolojik çözelti ile perfüze edilen boru şeklindeki bir diyaliz membranından oluşur. Diyaliz membranı yarı geçirgendir. Bu membran, tüm çözünenlerin değil, sadece bazılarının serbestçe taşınmasına izin verir. Geçirgenlik tipik olarak molekül kütlesi <20.000 Da olan bileşiklerle sınırlıdır. Mikrodiyaliz probu hedef bölgeye (genellikle bir kan damarı veya doku) implante edilir. Yöntemde kullanılan fizyolojik çözelti (perfüzet) probun yarı geçirgen zarından yavaş ve sürekli olarak pompalanır. Bu çözelti, bir süre sonra çevre doku sıvısı ile dengelenir. Elde edilen mikrodiyaliz çözeltisi (diyalizat), doku sıvısının moleküllerinin temsili bir oranını içerir. Diyalizat, uygun analitik tekniklerle ilaç veya hedef moleküllerin varlığını belirlemek için analiz edilir (CMA, 2020; Shippenberg ve Thompson, 1997). Mikrodiyalizde kullanılan problemler, eş merkezli olarak tasarlanmıştır. Bu problemler; beyin, damar veya dokulara implante edilmektedir. Problemlerin iç çapı yaklaşık 0,15-0,3 mm arasında olan ince bir diyaliz tüpünden oluşmaktadır. Probu ucunda bulunan yarı geçirgen zar maddelerin basif difüzyonuna izin verir. Bir perfüzyon sıvısı proba giriş tüpünden sabit bir akış hızıyla (0,5-5 ul / dk) girer, membrandan geçer, daha sonra çıkış tüpünden taşınır ve son olarak bir mikroviyal içinde toplanır. Genel olarak perfüzet, çevredeki ortamın bileşimini taklit eden sulu bir

çözüldür. Bu şekilde moleküllerin prob öncesi sıvı içine veya dışına aşırı geçişi önlenir (Plock ve Kloft, 2005). Numuneler anlık olarak analiz edilir veya daha sonraki analizler için biriktirilir. Çoğu analit için, intersitisyum ve perfüzyon ortamı arasındaki denge eksiktir; bu nedenle mikrodializ problemlerinin kalibre edilmesi gerekir. Çoğu kalibrasyon yöntemi, ilgili analitin perfüzyon ortamına ilave edilmesine ve prob ile doku arasında bir dengeleme ölçüsü olarak alınan; zardan kaybolma oranının ölçülmesine dayanır. Uygun kalibrasyon ile mikrodializ ölçümleri için bireyler arası değişim katsayıları analite bağlı olarak %10'dan %20'ye kadar değişmektedir (Joukhadar ve Müller, 2005).



**Şekil 2.** Mikrodializ Tekniğinde Perfüzate ve Diyalizat Arasındaki İlişki Diyagramı.

**A:** Analit; **P-A:** Proteine bağlı analiti temsil etmektedir (Weiss ve ark., 2000).

### Mikrodializ Probu

Klinik öncesi çalışmalar için piyasada çeşitli mikrodializ problemleri bulunmaktadır (Müller, 2002). Mikrodializ probu, ucunda yarı geçirgen bir zara sahip özel olarak tasarlanmış bir kateterdir. Prob, kan damarının işlevini taklit eder. Mikrodializ için kullanılan problemler, çalışma sırasında kullanılacakları yere bağlı olarak şekil ve malzemelerinde büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodializ probunun ilk ilkel versiyonu Delgado ve ark. (1972) tarafından üretilmiştir. Maymunlarda uzun süreli intraserebral perfüzyon

için kullanılan bu proba "dialyrotrot" adı verilmiştir. Probun yarı geçirgen zarı, bileşiklerin çok yoğun ortamdaki az yoğun ortama geçmesini sağlar. Prob hedef dokuya implante edildiğinde, düşük akış hızında (2 ul/dk) bir fizyolojik tuz çözeltisi ile sürekli perfüze edilir. Endojen maddeler, hücre dışı sıvıdan prob içindeki perfüzyona, difüzyon yoluyla süzülür. Aynı anda prob; ekzojen bileşikler, besinler ve ilaçları lokal olarak birkaç güne kadar toplamak için kullanılır. Mikrodializ probunun ana tasarımı, eş merkezli iki tüpün birleşimine benzer. İlk olarak; perfüzyon sıvısı iç tüpe girer, distal ucuna akar daha sonra tüpten çıkar ve iç tüp ile dış dializ membranı arasındaki boşluğa girer. İkinci olarak, akış yönü tersine çevrilir ve sıvı, probun proksimal ucuna doğru hareket eder. Bu aşamada "dializ" moleküllerin hücre dışı sıvı ile perfüzyon sıvısı arasındaki difüzyonu gerçekleştirir. Dokunun hücre dışı sıvısından maddeler kateter membranı boyunca kateter içindeki perfüzyon sıvısına, daha sonra bu maddeler toplanır ve analiz için prob çıkışına dağılır (Shippenberg ve Thompson, 1997).

### Perfüzyon Sıvıları

Mikrodializde kullanılan perfüzyon sıvıları, bileşim ve pH bakımından büyük farklılıklar gösterir. Perfüzyon sıvısının bileşimi; iyon gücü, ozmotik değeri ve pH'ı, dialize edilmiş dokunun hücre dışı sıvısına mümkün olduğunca yakın olmalıdır. Perfüzate, protein veya çok küçük bir konsantrasyonu olmaksızın, düşük oranda sodyum ve potasyum tuzları ve diğer iyonların sulu çözeltisidir. Bazı durumlarda, ilaçların mikrodializ probu ve tüp bağlantılarına yapışmasını önlemek için perfüzyon ortamına proteinler eklenmelidir. Nörotransmitter örnekleme için mikrodializ kullanan araştırmacılar endojen bileşiklerin miktarını doğru belirlemek için yüksek kalsiyum konsantrasyonlu perfüzyon çözeltileri



kullanılmaktadır (Maidment ve ark., 1989; Höcht ve ark., 2007). Tablo 1’de mikrodializ tekniğinde sıklıkla kullanılan perfüzyon sıvıları gösterilmektedir.

**Tablo 1.** Perfüzyon Çözeltilerinin Bileşimleri (Hocht ve ark., 2004; Höcht ve ark., 2007).

Perfüzyon ortamı Distile su	İçerik
Serum fizyolojik	% 0,9 NaCl
Ringer solüsyonu	147mM NaCl; 1.3 mM CaCl <sub>2</sub> ; 4 mM KCl (pH:7,2)
Krebs Ringer solüsyonu	138 mM NaCl; 1mM CaCl <sub>2</sub> ; 5mM KCl; 1mM MgCl <sub>2</sub> ; 11mM NaHCO <sub>3</sub>
Krebs Ringer solüsyonu	122 mM NaCl; 1.2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 3 mM KCl,
Bikarbonat	1,2 mM MgSO <sub>4</sub> ; 25 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 0.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH:7,4)
Ringer çözeltisi (safra tuzu)	155 mM NaCl; 5mM KCl; 2,3 mM CaCl <sub>2</sub> ; 20 mg/ml safra tuzu
Buffered Ringer solüsyonu	147 mM NaCl; 3,4 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2,8 mM KCl, 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,6 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 114 mM askorbat (pH:6,9)
Krebs- Henseleit	118 mM NaCl; 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 4,7 mM KCl
Bikarbonat	0,6 mM MgSO <sub>4</sub> ; 25 mM NaHCO <sub>3</sub>
Buffer	1,2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11mM glikoz
Mock	127 mM NaCl; 1.1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2,4 mM KCl
Serebrospinal	0,85 mM MgCl <sub>2</sub> ; 28 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5,9 mM glikoz (pH: 7,5)

### Mikrodializ Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

**Tablo 2.** Mikrodializ Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları (Azeredo ve ark., 2014; Erdo, 2015; Shippenberg ve Thompson, 1997; Zapata ve ark., 2009).

<b>Mikrodializ</b>	<p><b>Mikrodializ, en uygun <i>in vivo</i> tekniktir.</b> Çok küçük doku bölgelerinden lokal örnekleme için izin verir. Endojen, ekzojen maddeleri ve bunlarla ilgili metabolitleri izlemek için uygundur. Hücreler arası kimyasal iletimin sürekli izlenmesini sağlar. Hücre dışı sıvıda aranan analitlerin mutlak konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlar. Analizden önce numunelerin saflaştırılmasına gerek yoktur. Geri kazanılan maddelerin enzimatik parçalanma riski yoktur. Bir ilaç adayının doz ve zaman profilini belirlemek için diğer tekniklerden daha az hayvan deneyine gereksinim duyar.</p>
<b>Mikrodializin Avantajları</b>	<p><b>Mikrodializ <i>in vivo</i> örnekleme en fizyolojik yoldur.</b> Makromoleküller dokudan çıkamaz veya dokuya giremez. Örnekleme için itici güç sadece pasif difüzyondur. Probun yarı geçirgen zarı, dokuyu enfeksiyonlara karşı korur. Numuneler, serbestçe hareket eden hayvanlardan çalışma süresince sürekli olarak alınabilmektedir.</p>
<b>Mikrodializin Dezavantajları</b>	<p>MD probunun, beyne veya diğer hedef dokulara implantasyonu doku travmasına veya hasara neden olabilir. Beynin parankim dokusuna prob yerleştirilmesi 1-2 gün kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırabilir. Birkaç molekül mikrodializ düzeneğine özel olmayan bağlanma gösterir. Prob geri kazanımı % 100'e ulaşmadığından kalibrasyon gerekir. Bu teknik ile belirli zaman aralığındaki ortalama konsantrasyon ölçülür. MD, oldukça hassas analitik analiz yöntemlerine ihtiyaç duyar. MD yöntemini çalışmak için özel cerrahi bilgiye ihtiyaç vardır.</p>

**Doku Hasarı**

Mikrodiyalizde kullanılan probların, dokuya implante edilmesi sırasında deney sonuçlarını etkileyebilecek minimum doku hasarı oluşabilmektedir. Bu nedenle, prob yerleştirildikten sonra doku-prob dengesinin sağlanması için, prob genellikle yarım saatten fazla sürede bir fizyolojik çözelti ile perfüze edilir. Yaklaşık yarım saatlik bu süre "doku dengelenmesine" izin vermek için yeterli kabul edilmektedir. Hayvan ve insanların çeşitli dokularında ölçülen doku travması belirteçlerinin (tromboksan B2, adenosin trifosfat, adenosin, K<sup>+</sup>, glikoz, laktat, laktat / piruvat oranı) prob yerleştirildikten otuz dakika sonra temel seviyelere ulaştığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Mikrodiyaliz problarının yerleştirilmesinden sonra, lokal cilt dolaşımındaki değişiklikler Lazer Doppler perfüzyon görüntüleme kullanılarak araştırılmış ve değişikliklerin yaklaşık 40 dakika içinde başlangıç seviyesine geri döndüğü belirlenmiştir (Anderson, 1994). Küçük çaplı diyaliz tüplerinin implantasyonunun hayvanlarda ödem, yabancı cisim reaksiyonları veya kanamaya neden olmadığı yapılan çalışmada ortaya konulmuştur (Hickner ve ark., 1995).

**Kan Beyin Bariyeri Hasarı**

Mikrodiyaliz probunun beyne yerleştirilmesini takiben, kan beyin bariyerinin (KBB) hasarını değerlendirmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. KBB fonksiyonunun prob yerleştirilmesinden 2 saat sonra yeniden düzenlendiği kabul edilmiştir (Benveniste ve Hüttemeier, 1990). Ancak, KBB (kan-beyin bariyeri) hasarına dikkat çeken yayınlar da bulunmaktadır. Groothuis ve ark. (1998), probun beyne yerleştirildikten hemen sonra KBB geçirgenliğinde ilk artış ve yerleştirdikten 1-2 gün

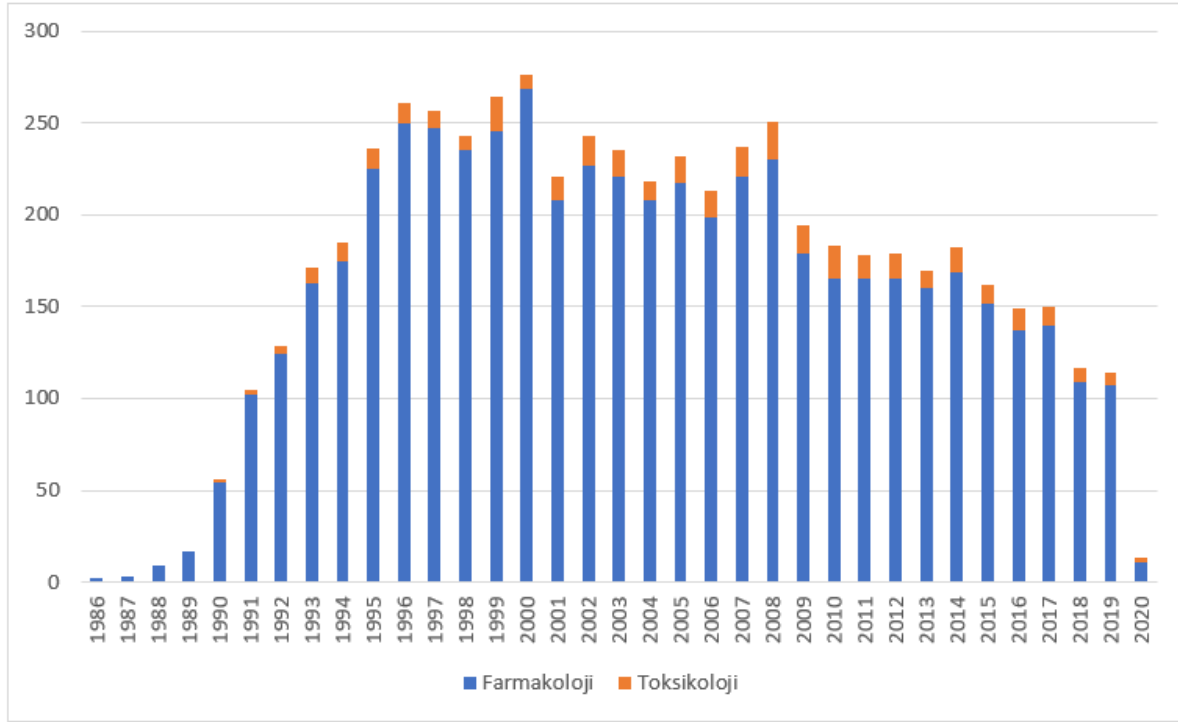
sonra ikinci artışın oluştuğunu ortaya koymuştur. Problar, KBB geçirgenliğini değiştirdiği ve interstisyel hücre sıvısındaki ilaç konsantrasyonlarının ölçümlerini bozduğundan; ilaçların KBB'den geçişinde mikrodiyaliz yöntemi beyinde titizlikle çalışmalıdır (De Lange ve ark., 1997; Groothuis ve ark., 1998; Westergren ve ark., 1995).

**Bakteriyel Kontaminasyon**

Mikrodiyalizde kullanılan probların, sterilizasyonu son derece önemlidir. Çünkü, gerekli sterilizasyon sağlanmadığında dokularda bakteriyel üremeyi takiben enfeksiyon ve inflamasyon şekillenebilmektedir. Mikrodiyaliz problarında farklı dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemlerini incelenmiştir. Bu farklı işlemlere tutulan probları, temiz bir odada (kontrol grubu) üretilmiş ve paketlenmiş problarla uzun süreli hayvan deneylerinde kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucu kontrol grubunda bile hayvanların sağlığının bozulmadığını, dolayısıyla probun aseptik kullanımının hayvanların sağlığının korunmasında yeterli olduğunu göstermiştir. Mikrodiyaliz, diğer örnekleme tekniklerine kıyasla probların yerleştirilmesi açısından minimal invaziv ve tolere edilebilir bir teknik olarak kabul edilmektedir (Huff ve ark., 2003).

**MİKRODİYALİZİN FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ARAŞTIRMALARDAKİ ROLÜ**

*In vivo* mikrodiyaliz tekniği, beyin ve periferik dokulardaki ilaç dağılımını ve metabolizmasını araştırmak için farmakoloji ve toksikoloji alanında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Chaurasia, 1999).



**Grafik 1.** Farmakoloji ve Toksikoloji Araştırmalarında Mikrodiyaliz Çalışmalarının Web of Science’da Yıllara Göre Dağılımı

Web of Science’da, “mikrodiyaliz (microdialysis)” anahtar kelimesi kullanılarak yapılan tarama sonucunda mikrodiyaliz; nörobilimlerde 10.171, farmakolojide 5.511 ve toksikoloji alanındaki 344 literatürle farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır.

### Antimikrobiyal İlaç Araştırmalarında

#### Mikrodiyaliz

Son yıllarda, antimikrobiyal maddelerin doku penetrasyonu hastalıkların tedavisinde önemli bir ön koşul olarak görülmektedir. Çünkü, antimikrobiyal tedavinin başarısızlığı sadece bakteriyel dirençle açıklanamamıştır. Mikrodiyaliz ile bakteriyel enfeksiyon için anatomik olarak tanımlanmış hedef bölge olan intersitisyel boşluktaki bağlanmamış farmakolojik olarak aktif antimikrobiyal ilacın çevrimiçi ölçümü sağlanır (Joukhadar ve ark., 2001). Doku-ilaç konsantrasyonlarını ölçebilen uygun

yöntemlerin kullanılması; farmakolojik ve mikrobiyolojik olarak ilgili bölmedeki ilaç konsantrasyonları hakkında bilgi sağlayarak, tedavinin başarı oranını arttırmaktadır (Joukhadar ve Müller, 2005). Antibiyotiklerle hedef doku penetrasyonu üzerine yapılan çalışmalar, klinik ilaç gelişiminin önemli bir parçası olmakla birlikte; daha çok deri kabarcığı veya biyopsi çalışmalarına dayanmaktadır. Özellikle, deri kabarcığı sıvısı ve doku homojenatlarındaki toplam ilaç doku konsantrasyonlarının ölçümü yanıltıcı olabilir. Çünkü, sadece intersitisyel sıvıdaki bağlanmamış ilaç fraksiyonu antibakteriyel aktivite uygulamaktadır. Bununla birlikte, klinik doku dağılımı çalışmalarına yönelik alternatif yöntem arayışı başlamıştır ve bu nedenle mikrodiyalize yönelinmiştir. Antimikrobiyal ilaç araştırması alanında mikrodiyaliz özellikle uygun bir teknik oluşturur. Çünkü, bu yöntem intersitisyel sıvıdaki

bağlanmamış ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesine izin verir. Son yıllarda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi danışma komitesi, mikrodiyalizin antimikrobiyal ilaçların doku dağılımı ile ilgili klinik çalışmalar için potansiyel bir yöntem olduğunu kabul etmiştir. Mikrodiyaliz tekniği, antibiyotik ajanların hastalık bölgesindeki bakterileri etkili bir şekilde yok etmek için yeterli bir sürenin mevcut olup olmadığı sorusunu cevaplamada önemli bir araçtır. Bu nedenle, mikrodiyaliz, çeşitli durumlarda antibakteriyellerin doku dağılımı hakkındaki bilgilerimizi büyük ölçüde artıracak ve hastalarda ilaç dozaj rejimlerini uygun şekilde değiştirmeye yardımcı olacaktır. Endüstriyel araştırmalarda, hedef bölge konsantrasyonlarının ilaç geliştirme sürecine entegrasyonu, gelecekte ilaçların daha rasyonel ve verimli bir şekilde geliştirilmesine ve kullanılmasına katkıda bulunacaktır (Merrikin ve ark., 1983; Müller, 2000; Merrikin ve ark., 1983; Kunin ve ark., 1973).

### Antineoplastik İlaç Araştırmalarında Mikrodiyaliz

Mikrodiyaliz problemleri tümör veya deriye yerleştirilir. Bu alanlarda, teknik *in vivo* penetrasyonu eşzamanlı olarak değerlendirmek için sitokinler de dahil olmak üzere ilaçları ve çözümleri endojen faktörleri toplar. İlaçlar, toplanan biyobelirteçler üzerindeki etkileri değerlendirmek için intratümöral veya dermise prob yoluyla verilir. Birçok çalışmada, insan doku ve tümörlerindeki antineoplastik ajanların *in vivo* ölçümleri (Blöchl-Daum ve ark., 1996; Ekstrom ve ark., 1996; Müller ve ark., 1997; Mader ve ark., 1998; Müller ve ark., 1998; Wu ve ark., 2000) için mikrodiyalizin uygun olduğu gösterilmiştir. Tümörler ile ilişkili MD çalışmaları, kemoterapi tedavisinin başarısızlığını antineoplastik ilaçların, tümörlerin intersellüler sıvıya yetersiz penetrasyonuna dayandırmaktadır (Jain, 1987,

1996). Tümör damarları arasındaki yetersiz ilaç penetrasyonu sonucu; tümörlere yönelik terapötik potansiyelin düştüğü mikrodiyaliz ile yapılan klinik çalışmalarla gösterilmektedir. Klinik onkolojik çalışmalarla mikrodiyalizin, belirlenmiş sitotoksik maddelerin başlangıç farmakokinetiğinin *in vivo* ölçülmesiyle kemoterapideki başarının öngörebileceği vurgulanmıştır. Ronquist ve ark. (1992) gliomların tedavisinde bölgeye özgü ilaç iletimi için MD problemlerini başarılı bir şekilde terapötik araçlar olarak kullanmıştır.

### Transdermal İlaç Çalışmalarında Mikrodiyaliz

Farmasötikler uzun yıllardır topikal olarak uygulanmaktadır. Son yıllarda transdermal ilaç uygulama sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Topikal ilaç tedavisi sırasında en önemli nokta; ilacın, klinik etkisini gösterebilmesi için cilde yüksek oranda ve hızlı bir şekilde nüfuz etmesidir. Bant sıyırma tekniği genellikle cildin en üst tabakası olan *Stratum corneum*'daki ilaç dağılımı hakkında bilgi verirken, daha derin cilt katmanları hakkında bilgi vermemektedir. Bu nedenle, düzenleyici otoriteler tarafından dermal mikrodiyaliz, biyoeşdeğerlik değerlendirmesi için potansiyel bir araç olarak kabul edilmektedir (Azeredo ve ark., 2014). Mikrodiyaliz, dermisteki ilaç seviyelerinin daha doğru gözlemlenmesini sağlar. Dermal mikrodiyaliz tekniği, eksise edilmiş deriden alınan mikrodiyaliz numunelerindeki 5-florourasil (5-FU) konsantrasyonunun reseptör hücresinden alınan numunelerdeki konsantrasyonla eşzamanlı karşılaştırılarak *in vitro* olarak doğrulanmıştır (Ault ve ark., 1992). Başka bir çalışmada, 5-FU'nun dermal akısını izlemek için sıçanların dermisine lineer problemler implante edilmiştir (Ault ve ark., 1994). Nikotin, transdermal uygulama sistemleri açısından önemli bir ilaçtır. Mikrodiyaliz

kullanılarak nikotinin kutanöz farmakokinetiği üzerinde yapılan bir çalışmada, nikotin için ilk saptanma ve maksimum konsantrasyona ulaşma süresinde farklılıklar ve maksimum nikotin konsantrasyonlarında bireyler arası ciddi farklar bulunmuştur (Hegemann ve ark., 1995). MD, transdermal ilaçların biyoeşdeğerlik çalışmalarında da potansiyel bir araç olarak kullanılmaktadır (Erdo, 2015).

#### **Ağrı Kesici İlaç Araştırmalarında Mikrodiyaliz**

Scott ve ark. (1991), asetaminofen ve sülfat, glukuronat metabolitlerinin farmakokinetiğini incelemek için sıvı kromatografiye bağlı *in vivo* mikrodiyaliz örneklemesini kullanmıştır. Numuneler, tek bir deney hayvanı kullanılarak sıvı kaybı olmadan sürekli olarak (5 saatten fazla) toplanmıştır. Mikrodiyaliz örneklemesi ile elde edilen farmakokinetik sonuçlar, kan alımından elde edilen sonuçlarla tam olarak uyumlu bulunmuştur. Gunaratna ve ark. (1994), yeni geliştirilen bir shunt probu kullanarak asetaminofenin, metabolik ve farmakokinetik profilini elde etmek için mikrodiyaliz tekniğini kullanmışlardır. Shunt problemlerinin oldukça uzun diyaliz membranı (3–6 cm) hassasiyeti arttırmaktadır. Prob, ilacın verilmesinden sonra ilacın metabolizması ve farmakokinetiği hakkında bilgi sağlamak için bir sıçanın safra kanalına implante edilmiştir (Gunaratna ve ark., 1994).

#### **Endojen Maddelerin Tespitinde Mikrodiyaliz**

##### **Nörotransmitterler**

Mikrodiyaliz, nörotransmitter salınımını saptamak, tanımlamak, ölçmek ve böylece akut beyin hasarı ve epilepside beyin nöromodülasyonunu daha iyi anlamak için kullanılan en temel yöntemlerden biridir. Özellikle, serebral mikrodiyaliz çoğunlukla nöroşürüjide klinik araştırma aracı olarak

kullanılmaktadır (Azeredo ve ark., 2014). Derin beyin stimülasyonu sırasında oral dozlamadan sonra levodopa farmakokinetiğinin yanı sıra, katekolamin düzeylerini belirlemek için Parkinson hastalarında nörotransmitter değişikliklerinin belirlendiği bir mikrodiyaliz çalışması yapılmıştır. Örnekleme zamanı derin beyin stimülasyonu sırasında beyin kimyasında olası değişiklikleri görmek için çok kısa olmasına rağmen; araştırmacılar bu tür klinik vakalarda mikrodiyaliz tekniğinin uygulanabilirliğini göstermişlerdir (Zsigmond ve ark., 2012).

#### **Glikoz Seviyelerinin İzlenmesi**

Hayati tehlikeye sahip hastaların, glisemik kontrolünün düzenli yapılması mortalite ve morbiditelerini önemli ölçüde azaltmakla birlikte tıbbi bakım maliyetini de düşürmektedir. Kan glikoz seviyelerini izlemek için intravenöz mikrodiyaliz kullanımı hala tartışmalıdır. Çünkü, özellikle kritik hastalarda bu yöntemin uygulanması doğru değildir. Feichtner ve ark. (2010), heparinize kanı periferik bir damardan *ex vivo* mikrodiyalizöre sürekli olarak çeken bir cihaz geliştirildi. Teknik ve klinik değerlendirmeler, sunulan cihazın doğru ve uzun süreli stabil kan glikoz seviyesini izlemede uygun mikrodiyalizat numuneleri sağladığını göstermektedir (Rooyackers ve ark., 2010).

#### **Biyobelirteç Seviyeleri**

Helmark ve ark. (2010), osteoartritli bir insan diz eklemine mikrodiyaliz probu yerleştirmiştir. Yapılan çalışmada, bu hastalarda fiziksel egzersizin fizyolojik etkisini belirlemek için kıkırdak ve iltihaplanmanın biyokimyasal belirteçleri ölçülmüştür. Sonuçlar, egzersiz yapmayan grupla karşılaştırıldığında, egzersiz yapan grupta hem intra-artiküler hem de peri-sinoviyal sıvıda interlökin-10 değerlerinin anlamlı şekilde arttığını göstermiş ve

egzersizin osteoartritli hastalar üzerindeki yararlı etkisi açıklanmıştır.

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrodiyaliz, teknik olarak çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu yöntem, hem insan hem de hayvanlarda gerek klinik öncesi gerek klinik çalışmalarda önemli bir örnekleme tekniğidir. Son yayınların birçoğunda; antibiyotiklerin (Müller ve ark., 1996), antitümör ajanların (Blöchl-Daum ve ark., 1996) ve nikotinin (Müller ve ark., 1995) doku kinetiğini araştıran mikrodiyalizin klinik kullanımı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, belirtilen maddelerin ekzojen olarak verildiğinde vücuttaki değişim kinetikleri araştırılmıştır (Müller ve ark., 1995). Mikrodiyalizle yapılan farmakolojik çalışmaların önemli bir bölümünde, endojen maddelerin deri altı hücre dışı sıvı konsantrasyonu incelenmiştir. Bu çalışmalarda, deri altı yağ dokusundaki glikoz, laktat, piruvat veya gliserol kinetiği oral uygulamadan sonra incelenmiştir. MD, insanlarda perifer dokulardaki ilaç konsantrasyonlarının da belirlenmesinde son yıllarda popüler bir yöntem haline gelmiştir. Bu teknik, metabolitlerin ve küçük moleküllerin hücre dışı sıvıda izlenmesi ve metabolik olarak aktif maddelerin bu bölmeyle lokal olarak verilmesini sağlar. Cimmino ve ark. (1997), mikrodiyalizle temel prensipleri (farklı prob tipleri, moleküler kesme, perfüzyon hızı, diyaliz tamponu) ve *in vivo* mikrodiyalizin teorik yönlerini (prob etkinliği, geri kazanım, perfüzyon hızı, doku metabolizmasının nicelendirilmesi) gözden geçirmişlerdir. Mikrodiyaliz ile yapılan periferik doku çalışmaları; iskelet kasları, deri altı yağ doku, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas, kan ve diğer periferik dokulardan oluşmaktadır (De la Peña ve ark., 2000). İskemik ve kemik doku hasarının belirlenmesine yönelik metabolitlerin doku kinetiği, insan iskelet kasının intersitisyel sıvı boşluğunda

mikrodiyaliz ile çalışılmıştır. MD, klinik farmakolojide de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. İnsanlarda deri (Boelsma ve ark., 2000), tümör ve yağ dokularının örnekleme (Mader ve ark., 1998) bu yöntemle yapılmıştır. İntraserebral mikrodiyaliz, subaraknoid kanaması ve gecikmiş iskemisi olan hastaları izlemek için de kullanılmıştır (Nilsson ve ark., 1999). Ayrıca, yenidoğan ve çocukların vücut yağlarından alınan mikrodiyaliz örnekleme (Hildingsson ve ark., 2000) ameliyat sonrası gliserol ve laktat üretiminde yaşa bağlı varyasyonları araştırmak için de kullanılmıştır. Klinik öncesi farmakokinetik çalışmalarda ihtiyaç duyulan hayvan sayısının mikrodiyaliz tekniği uygulanarak önemli ölçüde azaltılabileceği öne sürülmüştür. Mikrodiyaliz, vücut sıvısında kayba neden olmamakla birlikte kan homeostazında da değişiklik yaratmamaktadır. Bu nedenle, hayvandan alınan örnek miktarını sınırlamamaktadır. *In vivo* mikrodiyaliz, periferik dokulardaki bileşiklerin bağlanmamış konsantrasyonlarını eşzamanlı olarak izler. Doğru kalibrasyona sahip prob ile kombine edilen mikrodiyaliz, ilaçların farmakokinetiklerini farklı dokularda *in vivo* incelemek için güvenilir bir tekniktir (Fettweis ve Borlak, 1996). İlaçların farmakokinetik/farmakodinamik profilinin araştırılması, hem anestezide hem de uyanık hayvanlarda mikrodiyaliz ile gerçekleştirilir. Spesifik beyin bölgelerindeki nörotransmitter düzeylerindeki değişiklikler ve sağlık/hastalıklı hayvanlardaki biyobelirteç konsantrasyonlarının *in vivo* mikrodiyaliz tekniğiyle incelenmesi önerilmektedir (Erdo, 2015).

### GELECEKTE MİKRODİYALİZ

Mikrodiyaliz, doku kompozisyonu ve farmakokinetiğinin belirlenmesi için kullanılan en önemli örnekleme tekniklerinden biri haline



gelmiştir (Plock ve Kloft, 2005). MD tekniğindeki son gelişmeler göz önüne alındığında, yöntemin çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan güçlü bir araç olduğu görülmektedir. Biyolojik sıvı kaybı olmadığından teknik, küçük hayvanlar ve yeni doğanlar da dahil olmak üzere hemen hemen her bireye ve dokuya uygulanabilmektedir. Bu yöntem, hastalıkların tanısının yanında; nörotransmisyonun izlenmesi, ilaç geliştirme ve etkinlik denemelerinde de standart bir uygulama haline gelecektir. MD yöntemi ile; enfekte olmuş organların antibiyotik penetrasyonunu değerlendirilmesi, hastalık durumlarında doku metabolizmasının izlenmesi, kimyasal tahlillerin minyatürleştirilmesi ve çevrimiçi otomasyonu sağlanabilecektir (Müller, 2002). Ayrıca, bu yöntem; endojen metabolizma, farmakokinetik, farmakodinamik, hastalık durumu ve ilerlemesi de dahil olmak üzere biyomedikal araştırmalarda büyük bir değer olacaktır. Geçmişte yöntemde karşılaşılan; problemlerin kırılması, doku hasarı ve iltihabı, zaman alıcı kalibrasyon prosedürleri gibi bazı teknik sorunlar yöntemin gelişmesinde sorunlar yaratmıştır (Azeredo ve ark., 2014; Lönnroth, 1991). Ancak, analitik yöntemlerin sürekli geliştirilmesi mikrodializ uygulamalarının ilerlemesini ve karşılaşılan sorunların çözülmesini teşvik edecektir. Mikrodializ tekniğinin sunduğu fayda, gelecekteki farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar üzerinde de etkili olacaktır (De la Peña ve ark., 2000). Bu derlemede, mikrodializ tekniğinin farmakoloji/toksikoloji araştırmalarındaki potansiyeli gösterilmiştir. Klasik uygulama alanlarının dışında, akla gelebilecek hemen hemen her alanda MD önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır.

#### KAYNAKLAR

Anderson C, Andersson T, Wardell K. (1994). Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis

probe visualized by laser Doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol*, 102:807-811.

- Ault JM, Lunte CE, Meltzer NM, Riley CM. (1992). Microdialysis sampling for the investigation of dermal drug transport. *Pharm Res*, 9(10):1256-1261.
- Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE. (1994). Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res*, 11(11):1631-1639.
- Azeredo FJ, Dalla Costa T, Derendorf H. (2014). Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: current status and future directions. *Clin Pharmacokinet*, 53(3):205-212.
- Benveniste H, Hüttemeier PC. (1990). Microdialysis— theory and application. *Prog Neurobiol*, 35(3):195-215.
- Blöchl-Daum B, Müller M, Meisinger V, Eichler H, Fassolt A, Pehamberger H. (1996). Measurement of extracellular fluid carboplatin kinetics in melanoma metastases with microdialysis. *Br J Cancer*, 73(7):920-924.
- Boelsma E, Anderson C, Karlsson AM, Ponc M. (2000). Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin in vivo. *Pharm Res*, 17(2):141-147.
- Chaurasia CS. (1999). In vivo microdialysis sampling: theory and applications. *Biomed Chromatogr*, 13(5):317-332.
- Cimmino M, Geloan A. (1997). Tissue microdialysis: practical and theoretical aspects. *Diabetes Metab*, 23(2):164-170.
- CMA Microdialysis. (1984). Microdialysis Education. Erişim: [www.microdialysis.com](http://www.microdialysis.com). Erişim tarihi: 27.02.2020
- De la Peña A, Liu P, Derendorf H. (2000). Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, 45(2-3):189-216.
- De Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. (1997). Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res Rev*, 25(1):27-49.
- Delgado J. (1972). Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 198:9-21.
- Ekstrom PO, Andersen A, Saeter G, Giercksky KE, Slordal L. (1996). Continuous intratumoral microdialysis during high-dose methotrexate therapy in a patient with malignant fibrous histiocytoma of the femur: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol*, 39(3):267-272.
- Erdo F. (2015). Microdialysis Techniques In Pharmacokinetic and Biomarker Studies. Past, Present and Future Directions A Review. *Clin Exp Pharmacol P*, 5(180):1459-2161.
- Feichtner F, Schaller R, Fercher A, Ratzler M, Ellmerer M, Plank J, Krause B, Pieber T, Schaupp L. (2010). Microdialysis based device for continuous extravascular monitoring of blood glucose. *Biomed Microdevices*, 12(3):399-407.
- Fettweis G, Borlak J. (1996). Topics in xenobiochemistry— application of microdialysis techniques in

- pharmacokinetic studies. *Xenobh*, 26(5):473-485.
- Groothuis DR, Ward S, Schlageter KE, Itskovich AC, Schwerin SC, Allen CV, Dills C, Levy RM. (1998). Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes. *Brain Res*, 803(1-2):218-230.
- Gunaratna C, Lunte S, Zuo H. (1994). Shunt probe: a new microdialysis probe design for in vivo drug metabolism studies. *Curr Separations*, 13(3):80-83.
- Hammarlund-Udenaes M. (2017). Microdialysis as an important technique in systems pharmacology—a historical and methodological review. *AAPS J*, 19(5):1294-1303.
- Hegemann L, Forstinger C, Partsch B, Lagler I, Krotz S, Wolff K. (1995). Microdialysis in cutaneous pharmacology: kinetic analysis of transdermally delivered nicotine. *J Invest Dermatol*, 104(5):839-843.
- Helmark IC, Mikkelsen UR, Borglum J, Rothe A, Petersen MC, Andersen O, Langberg H, Kjaer M. (2010). Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*, 12(4):R126.
- Hickner RC, Ekelund U, Mellander S, Ungerstedt U, Henriksson J. (1995). Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *J Appl Physiol*, 79(2):638-647.
- Hildingsson U, Lönnqvist PA, Selldén H, Eksborg S, Ungerstedt U, Marcus C. (2000). Age-dependent variations in white adipose tissue glycerol and lactate production after surgery measured by microdialysis in neonates and children. *Pediatr Anesth*, 10(3):283-289.
- Hocht C, Opezzo JA, Taira CA. (2004). Microdialysis in drug discovery. *Curr Drug Discov Technol*, 1(4):269-285.
- Höcht C, Opezzo JA, Taira CA. (2007). Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. *J Pharmacol Tox Met*, 55(1):3-15.
- Huff JK, Bresnahan JF, Davies MI. (2003). Preliminary evaluation of several disinfection/sterilization techniques for use with microdialysis probes. *Life Sci*, 73(3):275-287.
- Jain RK. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47(12):3039-3051.
- Jain RK. (1996). Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Scienc*, 271(5252):1079-1080.
- Joukhadar C, Derendorf H, Müller M. (2001). Microdialysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 57(3):211-219.
- Joukhadar C, Müller M. (2005). Microdialysis: current applications to clinical pharmacokinetic studies and its role in the future. *Clin Pharmacokinet*, 44(9): 895-913.
- Kho CM, Ab Rahim SKE, Ahmad ZA, Abdullah NS. (2017). A review on microdialysis calibration methods: the theory and current related efforts. *Mol Neurobiol*, 54(5):3506-3527.
- Kunin CM, Craig WA, Kornguth M, Monson R. (1973). Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. *Ann NY Acad Sci*, 226(1):214-224.
- Lönnroth P. (1991). Microdialysis—a new and promising method in clinical medicine. *Intern Med J*, 230(4):363-364.
- Mader RM, Brunner M, Rizovski B, Mensik C, Steger GG, Eichler HG, Müller M. (1998). Analysis of microdialysates from cancer patients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(16-17):2981-2985.
- Maidment N, Brumbaugh D, Rudolph V, Erdelyi E, Evans C. (1989). Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience*, 33(3):549-557.
- Merrikin DJ, Briant J, Rolinson GN. (1983). Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *J Antimicrob Chemotherapy*, 11(3):233-238.
- Müller M. (2000). Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Adv Drug Deliv Rev*, 45(2-3):255-269.
- Müller M. (2002). Science, medicine, and the future: microdialysis. *BMJ*, 324(7337):588.
- Müller M, Brunner M, Schmid R, Mader RM, Bockenheimer J, Steger GG, Steiner B, Eichler HG, Blöchl-Daum B. (1998). Interstitial methotrexate kinetics in primary breast cancer lesions. *Cancer Res*, 58(14):2982-2985.
- Müller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B, Stanek G, Pehamberger H, Agneter E, Eichler H. (1996). Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(12):2703-2709.
- Müller M, Mader RM, Steiner B, Steger GG, Jansen B, Gnant M, Helbich T, Jakesz R, Eichler HG, Blöchl-Daum B. (1997). 5-Fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res*, 57(13):2598-2601.
- Müller M, Schmid R, Nieszpaur-Los M, Fassolt A, Lönnroth P, Fasching P, Eichler H. (1995). Key metabolite kinetics in human skeletal muscle during ischaemia and reperfusion: measurement by microdialysis. *Eur J Clin Invest*, 25(8):601-607.
- Müller M, Schmid R, Wagner O, Osten Bv, Shayganfar H, Eichler HG. (1995). In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis. *J Control Release*, 37(1-2):49-57.
- Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, Säveland H. (1999). Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery*, 45(5):1176-1185.
- Plock N, Kloft C. (2005). Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci*, 25(1):1-24.
- Ronquist G, Hugosson R, Sjölander U, Ungerstedt U. (1992). Treatment of malignant glioma by a new therapeutic principle. *Acta Neurochir*, 114(1-2):8-11.
- Rooyackers O, Blixt C, Mattsson P, Wernerman J. (2010). Continuous glucose monitoring by intravenous microdialysis. *Acta Anaesthesiol Scand*, 54(7):841-847.

- Scott DO, Sorenson LR, Steele KL, Puckett DL, Lunte CE. (1991). In vivo microdialysis sampling for pharmacokinetic investigations. *Pharm Res*, 8(3):389-392.
- Shippenberg TS, Thompson AC. (1997). Overview of microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, 1, Chapter 7: Unit7.1.
- Ungerstedt U. (1991) Microdialysis—principles and applications for studies in animals and man. *Intern Med J*, 230(4):365-373.
- Weiss DJ, Lunte CE, Lunte SM. (2000). In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trac Trend Anal Chem*, 19(10):606-616.
- Westergren I, Nyström B, Hamberger A, Johansson BB. (1995). Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 64(1):229-234.
- Wu Z, Smithers B, Anderson C, Roberts M. (2000). Can tissue drug concentrations be monitored by microdialysis during or after isolated limb perfusion for melanoma treatment? *Melanoma Res*, 10(1):47-54.
- Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. (2009). Microdialysis in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, 47(1):7.2. 1-7.2. 29.
- Zsigmond P, Dermroth N, Kullman A, Augustinsson L-E, Dizdar N. (2012). Stereotactic microdialysis of the basal ganglia in Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 207(1):17-22.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 15-20, 2021  
DOI: 10.38137/vftd.900797

## TAMAMLAYICI-GELENEKSEL TIP KAPSAMINDA FİTOTERAPİ VE KANSER YAKLAŞIMI

İsmail KURHAN <sup>1a</sup>, Hüsamettin EKİCİ <sup>1b</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0001-9895-9241, ORCID<sup>b</sup>: 0000-0001-6403-737X

\*Sorumlu Yazar: İsmail KURHAN  
E-Posta: i.kurhan@hotmail.com

Geliş Tarihi: 21.03.2021  
Kabul Tarihi: 13.04.2021

### ÖZET

Fitoterapi özellikle kanser hastaları tarafından sıklıkla başvurulan tedavi yöntemlerindedir. Bu incelemede fitoterapinin kanser ile ilişkisi ve kanser türlerinde farmakolojik ilaç kullanımına ek olarak tercih edilmesi değerlendirilmiştir. Literatür 2000- 2021 yılları arasında yayınlanmış fitoterapi çalışmaları yönünden taranmıştır. Veriler “Pubmed ve Siencedirect” gibi veri tabanlarında “complementary and alternative medicines, phytotherapy, herbal medicine, cancer” kelimeleri aranarak elde edilmiştir. Fitoterapinin Çin ve Güney Kore gibi uzak doğu ülkelerinde yaygın bir şekilde kullanıldığı, ilk uygulandığı Mezopotamya bölgesi sınırları içerisindeki Filistin’de ise kullanımının %90 düzeylerinde olduğu gözlenmiştir. Gelişmiş ülkelerde, Uzakdoğu ülkelerine kıyasla daha az tercih edilen bitkisel ilaç uygulamalarının günümüzde daha çok tercih edildiği görülmüştür. Bunun nedenleri arasında geleneksel tıbbi yöntemler ve farmakolojik ilaç kullanımının yan etkileri sayılmaktadır. Ayrıca kanser vakalarındaki yaygınlık oranlarının yükselmesi bu yönelimi desteklemektedir. 2020 yılı dünya kanser vakaları; cinsiyet gözetmeksizin göğüs, akciğer, kolo-rektal, ölümler; akciğer, kolo-rektal, karaciğer şeklinde sıralanmaktadır. Fitoterapi tahmin edilemeyen yan etkilerine rağmen tüm dünyada hızla uygulanmaya devam etmektedir. Özellikle modern tıbbın tam olarak tedavi edemediği kanser gibi hastalıkların olması bunu tetiklemektedir. Sonuçta, kontrolsüz bitkisel ilaç kullanımı geleneksel tedavilerde tehditler ortaya çıkartmakta, bu durum ülkeleri yasal düzenlemeler yapmaya teşvik etmektedir. Yapılması gereken, fitoterapi uygulamalarında kullanılan bitkilerin farmakolojik ve toksikolojik parametrelerinin belirlenmesi, belirlenen parametreler ile bitkisel ilaçların kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden standartlarının oluşturulmasıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Bitkisel İlaç, Fitoterapi, Kanser, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp.

### PHYTOTHERAPY AND CANCER APPROACH IN COMPLEMENTARY- TRADITIONAL MEDICINE

#### ABSTRACT

Phytotherapy is one of the most frequently used treatment methods, especially by cancer patients. In this review, the relation of phytotherapy with cancer and its preference in addition to the use of pharmacological drugs in cancer types were evaluated. The literature was reviewed in terms of phytotherapy studies published between 2000-2021. The data were obtained by searching the words “complementar-alternative medicines, phytotherapy, herbal medicine, cancer” in databases such as “Pubmed and Siencedirect”. It has been observed that phytotherapy is widely used in Far East countries such as China and South Korea, and its use is around 90% in Palestine within the borders of Mesopotamia where it was first applied. The reasons for this are the side effects of traditional medical methods and pharmacological drug use. Besides, the increase in the prevalence rates in cancer cases supports this trend. World cancer cases in 2020 are listed as breast, lung, colo-rectal, and deaths as lung, colo-rectal, liver regardless of gender. Phytotherapy continues to be applied rapidly all over the world despite its unpredictable side effects. Especially the presence of diseases such as cancer that modern medicine cannot fully cure triggers this. As a result, uncontrolled use of herbal medicine creates threats in traditional treatments, and this situation encourages countries to make legal regulations. Thing to do is to determine the pharmacological and toxicological parameters of the plants used in phytotherapy applications, it is to establish the standards of herbal medicines in terms of quality, safety and efficacy with the determined parameters.

**Keywords:** Cancer, Complementary and Alternative Medicines, Herbal Medicine, Phytotherapy.

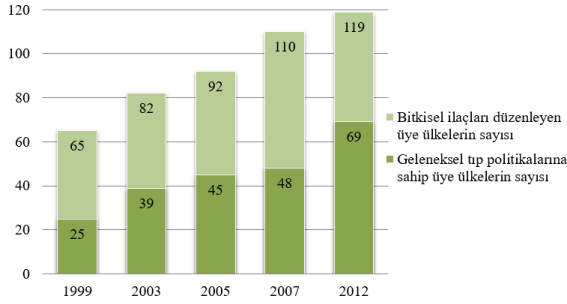
## GİRİŞ

Geleneksel tıp (TM) sağlık halinin sürdürülebilmesi amacıyla hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için kullanılan çoklu kültürel inanç ve deneyimle harmanlanmış bilgi, birikim ve uygulamalar yığını olarak tanımlanabilir (WHO, 2013). Çoklu kültürel aktarımlar “Geleneksel Çin Tıbbı, Geleneksel Hint Tıbbı, Greko-Romen Tıbbı, Osmanlı Tıbbı” gibi ülke sınırları ya da kültürleri ile sınırlandırılmaktadır. Tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) terimleri ise bir ülkenin kendi TM anlayışının ötesinde daha geniş sağlık uygulamalarını kapsamaktadır. CAM/TM terimlerinin tanınması ve düzenlenmesi ülkelere göre önemli ölçüde farklılık gösterirken bazı ülkelerde CAM ve TM benzer anlamlarda da kullanılmaktadır (Mordeniz, 2019). Eski zamanlarda şifalı bitkilerden ilaçların elde edilmesi, günümüzde insanlığı hastalıktan doğrudan veya dolaylı olarak kurtaran mevcut mucizevi bileşiklerin keşfine yol açmıştır (Kurhekar, 2021). Bitkilerle tedavi, modern tıbbi yöntemlerin dışında yer alan fakat modern tıbbi yöntemlere en yakın tedavi uygulamalarıdır (Heinrich, 2017). Fitoterapi; tıbbi bitkilerin, geleneksel kullanımı, deneysel gözlemler, in vitro, in vivo ve terapötik etkilerin klinik incelemesinin sistematik bir değerlendirmesine dayanan uygulanmasıdır. Tamamlayıcı olarak adlandırılan tüm terapiler arasında fitoterapi en fazla bilimsel desteği alan terapidir (Ghosh, 2016). İnsanlık tarihinde çok kadim geçmişe sahip bu yöntem ilk kez 19. yy başlarında yaşamış Fransız hekim Henri Leclerc tarafından literatüre kazandırılmıştır. Leclerc’in fitoterapiyi, bitkileri kullanarak hastaları tedavi etme anlamında La Presce Medical adlı dergide kullandığı bilinmektedir (Yurdakök, 2010; Kurhekar, 2021). Bitkisel ilaçlar, aktif bileşen yapıda bitkilerin kısımlarını veya diğer bitki

materyallerini veya kombinasyonlarını içeren şifalı bitkiler, bitkisel materyaller, bitkisel preparatlar ve bitmiş bitkisel ürünleri kapsar. Bu geniş bağlamda fitoterapi, dünya üzerindeki pek çok toplum tarafından hastalıklardan korunma ve tedavi amacıyla öncelikli olarak tercih edilmektedir. Zamanla teknoloji gelişmiş ve bitkisel tedavi yerini modern ve sentetik ilaçlara bırakmıştır (Conway, 2011; WHO, 2013).

Çağımızda, daha önce tanımlayamadığımız ve bu günkü modern tıbbi yöntemlerle tedavi edemediğimiz kanser gibi hastalıkların mevcudiyeti fitoterapiyi yeniden popüler konuma taşımıştır. Özellikle kanserin morbiditesi ve mortalitesindeki engellenemez artış hastaların hayata tutunma arayışlarını çeşitlendirerek, onları öncelikli olarak bitkisel tedaviye sürüklemektedir (Wang ve ark., 2020). Kanser tedavisinde kullanılan modern yöntemler ve farmakolojik ilaçların pahalı olması, hasta konforunu düşüren ciddi yan etkiler ve toplum baskısı gibi nedenler bu yönelimin başında gelmektedir. Fitoterapi uygulamalarında bitkiler saflaştırılmadan ihtiva ettiği her türden bileşenle komplike kullanıldığı için daha etkili olduğu ve yan etkiden arı olduğu düşünülmektedir. Bazen bitkilerdeki bileşenlerin sinerjik etkisi veya toksiteyi nörtalize etme durumu hastaları rahatlatmaktadır. Ancak tersi durumlarla da karşılaşmakta ve rutin tedavi olumsuz etkilenmektedir (Pezzani ve ark., 2019). Birçok ülkenin sağlık sistemine entegre olmayan geleneksel ve tıbbi tedavi uygulamalarının entegrasyonu amacıyla WHO üye devletler nezdinde stratejiler geliştirmektedir. Strateji, üye devletleri proaktif politikalar geliştirmede ve geleneksel tıbbın popülasyonlarını sağlıklı tutmada oynadığı rolü güçlendirecek eylem planlarını uygulamaları için desteklemeyi amaçlamaktadır (WHO, 2013). Bu amaçla üye devletler yeni düzenlemelerle

önlemlerini genişletmektedir (Şekil 1).



**Şekil 1.** WHO Geleneksel Tıp Stratejisinde tanımlanan ülke ilerleme göstergeleri (WHO, 2013).

### Fitoterapi ve Kanser

Fitoterapinin Çin ve Güney Kore gibi uzak doğu ülkelerinde yaygın bir şekilde kullanıldığı, ilk uygulandığı Mezopotamya bölgesi sınırları içerisindeki Filistin'de ise kullanımının %90 düzeylerinde olduğu gözlenmiştir. Bitkisel ilaç uygulamaları gelişmiş ülkelerde, Uzakdoğu ülkelerine kıyasla daha az tercih edilirken günümüzde tamamlayıcı ve alternatif tıp olarak yüksek bir popülariteye sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, İsviçre, Küba, Japonya, Şili gibi ülkelerde nüfusun %40'ından fazlası geleneksel ve tamamlayıcı tıbbi genellikle yılda bir kez kullanmaktadır (Park ve ark., 2016). Almanya, gelişmiş ülkeler arasında fitoterapinin tanıtımı ve kullanımında önde gelen ülkedir ve reçetelerinin yaklaşık %40'ını bitkisel tıbbi ürünler oluşturmaktadır (Santos ve ark., 2011). Bunun nedenleri arasında geleneksel tıbbi yöntemler ve farmakolojik ilaç kullanımının yan etkileri sayılmaktadır. Nitekim kanser hastalarının kemoterapiye bağlı kabızlık ile baş etmek için kullandıkları TM/CAM ilaçların araştırıldığı bir çalışmada katılımcılar arasında hastaların kullandığı en yaygın yöntemin %97,1 ile fitoterapi olduğu tespit edilmiştir (Toygur ve ark., 2020). En az gelişmiş ülkeler incelendiğinde düşük maliyeti ve

kolay erişimi nedeniyle fitoterapi birinci basamak sağlık hizmeti olmaya devam etmektedir (Leite ve ark., 2021). Ayrıca kanser vakalarındaki yaygınlık oranlarının yükselmesi bu yönelimi desteklemektedir. 2020 yılında dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser kaynaklı ölümün meydana geldiği ifade edilmektedir (Sung ve ark., 2021). Her iki cinsiyet birlikte, tüm vakaların yarısının ve kanser ölümlerinin %58,3'ünün 2020'de Asya'da gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Avrupa, dünya nüfusun %9,7'sini temsil etmesine rağmen, toplam kanser vakalarının %22,8'ini ve kanser ölümlerinin %19,6'sını oluşturmaktadır. Bunu Amerika'nın %20,9'u ve dünya çapında ölümlerin %14,2'si izlemektedir. Diğer bölgelerin aksine, Asya'da (%58,3) ve Afrika'da (%7,2) kanser türlerinin farklı dağılımları ve daha yüksek vaka nedeniyle kanser ölümlerinin payı, insidans payından (sırasıyla %49,3 ve %5,7) daha yüksek olduğu görülmektedir. Kadın meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir (toplam vakaların %11,7'si). Bunu akciğer (%11,4), kolo-rektal (%10), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri takip etmektedir. Akciğer kanseri, cinsiyet fark etmeksizin kanserden ölümlerin (toplam kanser ölümlerinin %18'i) başlıca nedenidir. Bunu kolo-rektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemektedir. Akciğer kanseri, erkeklerde en sık meydana gelen kanserdir ve kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir. Bunu insidans için prostat ve kolo-rektal kanser ve ölüm için karaciğer ve kolo-rektal kanser izlemektedir. Kadınlarda meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir ve kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir (IARC, 2021). Kanser yükü tüm İnsani Gelişme Endeksi (İGE) düzeylerinde önemli ölçüde artmakta ya da yön değiştirmektedir. En gelişmiş ülkelerde yaygın olan (meme, akciğer, kolorektum,



prostat) kanser türlerinin yoksullukla ilişkili kanserlerle (rahim ağzı, karaciğer, mide) yer değiştirdiği gözlenmiştir (Fidler ve ark., 2016). Yapılan projeksiyonlarda 2020'deki 19,3 milyon vakadan %47'lik bir artışla 2040 yılında 28,4 milyon vakaya çıkması tahmin edilmektedir. Artışın göreceli büyüklüğü, en çok İGE'nin düşük olduğu ülkelerde (%95) ve orta İGE ülkelerinde (%64) olarak hesaplanmıştır (Sung ve ark., 2021b). Kanser gelecekte insanlık için daha büyük riskler ve tehditler içerecek olması, bitkisel tedavi çalışmalarından alınan olumlu sonuçlarla değerlendirilince fitoterapiye yönelim artışı hızlanmaktadır (Jones ve ark., 2019).

Bazı araştırmalar kanser immunoterapisi açısından bitkisel tedavinin olumlu yanıtlarını ortaya koymuştur. Akciğer, meme ve yumurtalık kanseri hücreleri gibi tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını inhibe ederken apoptozunu teşvik ettiğini göstermiştir. Prostat kanserinin anjiyogenezini ve tümör büyümesini baskıladığı gösteren çalışmalar da bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020). Başka bir çalışmada ise çoklu bitkisel karışımdan oluşan bir fitoterapi ürününün makrofajların tümör hücreleri üzerindeki öldürücü etkilerini güçlendirdiği verisine ulaşılmıştır (Liang ve ark., 2018). Son yıllarda, tümörle ilişkili makrofajlarda, fagositozunu ve antitümör immün fonksiyonlarını inhibe eden programlanmış hücre ölüm proteini (PD-1)'i eksprese edebildiğinin bulunması (Villadolid ve Amin, 2015; Gordon ve ark., 2017) bunu teyit etmiştir. Kemoterapi ile kombine astragalus bitkisi tedavisinin, bu kimyasal ilaçların neden olduğu toksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (Auyeung ve ark., 2016; Auyeung ve ark., 2016). Geleneksel Çin tıbbında sindirim sistemi rahatsızlıklarında uzun süreler kullanılan Baizhu ve Cangzhu'nun yapısındaki atractylenolides

maddesinden dolayı çoklu tümör endikasyonlarına karşı belirgin antikanser etkiler sergilediği tespit edilmiştir (Bailly, 2021).

Bitkisel ürünleri içeren tedaviler potansiyel faydalar göstermesine rağmen her durumda tamamen doğal ve güvenli değildir (Jones ve ark., 2019). Bitkisel ürünler doğal kaynaklardan gelse de, içlerinde bulunan biyoaktif bileşenler, ilaç metabolize eden enzimlerin veya taşıyıcıların indüksiyonu veya inhibisyonu yoluyla istenmeyen etkileşimlere yol açabilirler (Nanjappan ve ark., 2018). Bu, bitkisel ürünlerin çoğunun hiç test edilmemiş olması ve kullanımlarının genellikle yeterli bir şekilde izlenmemesinin sonucudur. (National Cancer Institute, 2015). Bitkisel ilaçların kullanımı giderek arttığı için toksikolojik etki mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir. Bu ürünlerin tüketicilerinin yanlış dozaj ve uygulamalarıyla ilişkili olabilecek risklerin farkında olması için yeterli bilgiye ihtiyaç vardır (Oyedepo ve Palai, 2021). Özet olarak denemede fitoterapi ve kanser ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, dünyanın içerisinde bulunduğu ekonomik sıkıntılar, iklim değişikliği, nüfus artışı ve yaşlanma gibi faktörler hesap edildiğinde TM/CAM'a olan taleplerin artacağı tahmin edilmektedir. Dolayısıyla fitoterapinin geçmişe göre çok daha fazla tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkacağı düşünülmektedir. Ancak bitkilerin tedavide saflaştırma ve ekstrakte etme gibi yöntemler kullanılmadan uygulanması önemli bir toksik yan etkiyi oluşturabilmektedir. Bitkiler, yapılarında alkaloid, polisakkarit, glikozitler ve flavonoidler gibi bilinen ya da hala tespit edilememiş birçok maddeyi barındırırlar. Bu maddeler bilinen ve bilinmeyen pek çok biyolojik ajan ve reseptörle

etkileşime girerler ve istenmeyen klinik vakalar meydana getirebilirler. Kanser tedavi protokollerinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi ilaç ve yöntemlerin yanında, fitoterapi uygulamalarının artan ivmeyle kullanıldığı kabul edilmektedir. Özellikle modern tıbbi tedavi yöntemlerinin tamamlandığı ve sonuç alınamayan vakalarda; ayrıca ilaç yan etkilerinin azaltılması amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yönelimlerden bazen olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Ancak birçok vakada istenmeyen sonuçlarla karşılaşıldığı rapor edilmiştir. Yapılması gereken, fitoterapi uygulamalarında kullanılan binlerce yıllık birikimin nicel klinik çalışmalarla ortaya konulması, devamında bitkilerin farmakolojik ve toksikolojik parametrelerinin belirlenmesi, sonuçların kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden standardizasyonlarının yapılarak kullanılmalardır. Böylece fitoterapiye bağlı kanser tedavisinde daha iyi sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Auyeung, K. K., Han, Q. Bin and Ko, J. K. (2016). *Astragalus membranaceus*: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers. *American journal of Chinese medicine*, 44(1), 1–22.

Bailey, C. (2021). *Atractylenolides, essential components of Atractylodes-based traditional herbal medicines: Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties*. *European journal of pharmacology*, 891, 173735

Begüm, Y. (2010). *Türkiye’de Yetişen Eryngium Kotschy (Boğa Dikeni) ve Eryngium Martium (Deniz Boğadikeni) Bitkilerinin Sitotoksik Etkilerinin HEP2, HEPG2, VERO ve U138 MG Hücre Kültürlerinde Araştırılması*. Ankara, Türkiye.

Conway, P. (2011). *The therapeutic relationship in phytotherapy*. Elsevier

Fidler, M. M., Soerjomataram, I., Bray, F. (2016). *A global view on cancer incidence and national levels of the human development index*. *International journal of cancer*, 139(11), 2436–2446.

Ghosh, D. *Seed to patient in clinically proven natural medicines in nutraceuticals. Efficacy, Safety And Toxicity*. Elsevier Inc.; 2016. pp. 925–931.

Heinrich Michael (2017). *Phytotherapy | medicine |*

Britannica. Erişim adresi: [https://www.britannica.com/science/phytotherapy]. Erişim tarihi: 17.02.2021.

IARC (2021). *Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. Erişim adresi: [https://gco.iarc.fr/today/home]. Erişim tarihi: 17.02.2021

Jones, E., Nissen, L., McCarthy, A., Steadman, K., Windsor, C. (2019) *Exploring the use of complementary and alternative medicine in cancer patients*. *Integrative cancer therapies*, 18, p. 153473541984698.

Kurhekar, J. V. *In preparation of phytopharmaceuticals for the management of disorders*. *Ancient and Modern Practices in Phytomedicine*. Elsevier; 2021. pp. 55–75.

Leite, P. M., Camargos, L. M., Castilho, R. O. (2021). *Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective*. *European journal of integrative medicine*, 41, p. 101270.

Liang, P., Guo, J., Li, S., Guan, Q., Vanderheyden, T., So, A., Wang, Y., Chen, T., Du, C. (2018). *Prevention of prostate tumor development by stimulation of antitumor immunity using a standardized herbal extract (Deep Immune®) in TRAMP Mice*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2018, 1-12.

Mordeniz, C. (2019). *Introductory Chapter: Traditional and Complementary Medicine*. IntechOpen

Nanjappan, S., Paul, D., Bolla, L. *Assessing herb–drug interactions of herbal products with therapeutic agents for metabolic diseases: analytical and regulatory perspectives*. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V.; 2018. pp. 283–322.

National Cancer Institute (2015). *Complementary and Alternative Medicine (CAM)*. Erişim adresi: [https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam]. Erişim tarihi: 19.02.2021.

Oyedepo, T. A., Palai, S. *Herbal remedies, toxicity, and regulations. Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. Elsevier; 2021. pp. 89–127.

Park, Y. L., Huang, C. W., Sasaki, Y., Ko, Y., Park, S., Ko, S. G. (2016). *Comparative study on the education system of traditional medicine in China, Japan, Korea, and Taiwan*. *Explore: The journal of science and healing*, 12(5), pp. 375–383.

Pezzani, R., Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zuñiga, F. A., Sharifi-Rad, J., Martins, N. (2019). *Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective*, *Medicina (Lithuania)*, 55(4), 110.

Santos, R. L., Guimaraes, G. P., Nobre, M. S. C., Portela, A. S. (2011). *Analysis about phytotherapy as an integrating practice in the Brazilian Unified Health System (Uhs)*. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 13(4), 486–491.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. Bray, F. (2021).

- Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A cancer journal for clinicians*.
- Toygar, I., Yeşilbalkan, Ö. U., Kürkütü, M., Aslan, A. (2020). Complementary and alternative medicines used by cancer patients to cope with chemotherapy-induced constipation. *Complementary therapies in clinical practice*, 39, 10108.
- Villadolid, J., Amin, A. (2015). Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: Update on management of immune-related toxicities. *Translational lung cancer research*, 4(5), 560.
- Wang, Y., Zhang, Q., Chen, Y., Liang, C. L., Liu, H., Qiu, F., Dai, Z. (2020). Antitumor effects of immunity-enhancing traditional Chinese medicine. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 121, 109570.
- WHO., (2013). World Health Organization. *Traditional Medicine Strategy 2014-2023*, World Health Organization. Elsevier. pp. 1–76.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 21-32, 2021  
DOI: 10.38137/vftd.897776

## SİTOKİNLER VE KANATLILARDA SİTOKİNLERİN AŞI ADJUVANTI OLARAK KULLANIMI

Aziz Utku ÖNEL <sup>1a</sup>, Murat YILDIRIM <sup>1b</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0003-4596-7461, ORCID<sup>b</sup>: 0000-0002-9576-2280

\*Sorumlu Yazar: Aziz Utku ÖNEL  
E-Posta: autkuvi@hotmail.com

Geliş Tarihi: 18.03.2021  
Kabul Tarihi: 23.04.2021

### ÖZET

Kanatlı hayvanlarda hastalıkların önlenmesi ve sağaltımı aşılarda ve antibiyotiklerin kullanılması ile sağlanır. Antibiyotiklerin uzun yıllar boyunca kullanılması antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkması ile ilgili sorunları beraberinde getirmiştir. Hastalıkların önlenmesinde kullanılan aşılardaki adjuvantlar, sağlık üzerinde yan etkilere sahip olabilir ve immun yanıtı yetersiz bir şekilde uyarabilir. Bu nedenle kanatlı endüstrisinde yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Sitokinler, yangı reaksiyonlarında hayati rol oynayan hücreler tarafından salgılanan immun sistem hücrelerinin aktivasyonu ve düzenlenmesini sağlayan peptitlerdir. Kanatlı immunolojisi ve genetik alanındaki gelişmeler, özellikle tavukta çeşitli sitokinlerin keşfedilmesine ve bu sitokinlerin işlevsel özelliklerinin ve mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamıştır. Kanatlı hayvanlarda enfeksiyöz ajanlara karşı kullanılan aşılarda sitokinlerin potansiyel bir aşı adjuvantı olarak kullanılması yönünde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu derlemede kanatlı sitokinlerinin çeşitleri, fonksiyonel özellikleri ve sitokinlerin aşı adjuvantı olarak kullanımı hakkında bilgi vermek amaçlandı.

**Anahtar Kelimeler:** Adjuvant, Aşı, Kanatlı İmmunolojisi, Sitokinler.

## CYTOKINES AND THE USE OF CYTOKINES AS VACCINE ADJUVANT IN POULTRY

### ABSTRACT

Prevention and treatment of diseases in poultry is provided by the use of vaccines and antibiotics. The use of antibiotics for many years has brought problems with the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Adjuvants in vaccine used in the prevention of diseases may have adverse health effects and may inadequately stimulate the immune response. Therefore, the development of new vaccine strategies has become a crucial issue in the poultry industry. Cytokines are peptides that enable the activation and regulation of immune system cells secreted by cells that play a vital role in inflammation reactions. Avian immunology and genetic components have led to the discovery of various cytokines, especially in chicken and to understand the functional properties and mechanisms of these cytokines. Many studies have been conducted on the use of cytokines as a potential vaccine adjuvant in vaccines used against infectious agents in poultry. In this review, we aimed to give information about the types and functional properties of avian cytokines and the use of cytokines as vaccine adjuvants.

**Keywords:** Adjuvant, Avian Immunology, Cytokines, Vaccine.

### GİRİŞ

Sitokin terimi ilk olarak Cohen ve ark. (1974) tarafından kullanılmıştır. Sitokinler, immunolojik gelişim ve immun yanıtın gelişimi esnasında hücreler arasında hücre dışı sinyaller olarak etki eden moleküler ağırlıkları 30 kilodalton (kDa)'dan daha az olan düzenleyici peptitlerdir. Sitokinler bir

immun yanıtı ortaya çıkarır ve bu immun yanıtı düzenler ve aslında immun sistem hücreleri üzerinde pleiotropik etkiye sahip tüm hücre çeşitleri aracılığıyla üretilebilmelerinin yanı sıra yangı yanıtını da düzenlemektedirler (Kaiser ve Staheli, 2014). Son yıllarda, kanatlı immunolojisi ve genetik çalışmalarındaki gelişmeler, esas olarak tavuk ve

diğer kuş türlerinde bir dizi sitokin keşfedilmesine olanak sağlamıştır (Umar ve ark., 2015). Kanatlı sitokinlerine karşı göreceli olarak az sayıda rekombinant sitokin ya da monoklonal antikor üretilmesine rağmen, real-time kantitatif PCR gibi yeni teknolojilerin mevcudiyeti, protein veya antikorlara ihtiyaç duyulmadan sitokin genlerinden mRNA ekspresyonunun ölçülmesine izin verir (De Boever ve ark., 2010; Downing ve ark., 2010). Bu teknoloji, hastalıkta sitokin seviyesini belirleme olasılıklarını artırmıştır. Sitokin seviyelerinin belirlenmesi hem patogeneze hem de bağışıklık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Kalaiyarasu ve ark., 2013; Yao ve ark., 2014).

Kanatlı hayvanların kümeslerde yoğun bir şekilde yetiştirilmesi patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların artmasına neden olmaktadır. Hayvan beslemede kullanılan antibiyotikler, enfeksiyonun üstesinden gelmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Umar ve ark., 2015). Bununla birlikte, antibiyotiklerin beslemede uzun süre kullanımı antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkması ile ilgili birçok sorunu ortaya çıkarmıştır (Meng ve ark., 2011). Beslemede antibiyotik kullanımından uzaklaşma, daha etkili aşı stratejilerinin kullanımına olan vurguyu kritik bir şekilde artırır (Umar ve ark., 2015).

Kanatlı hayvanlar için aşılar, özellikle yıllık olarak büyük ölçekte ihtiyaç duyulduğunda uygun maliyetli olmalıdır. Bu neden ile ruhsatlı veteriner aşılarında bulunan en yaygın adjuvantlar alüminyum tuzları ve yağ emülsiyonları olmak üzere mevcut aşılama ekonomisine dayalı olarak tasarlanmıştır (Redmond ve ark., 2009). Veteriner ve insan aşı üreticileri, göreceli güvenliği nedeniyle yaygın olarak alüminyum hidroksit (alum)

adjuvantı kullanmıştır (Umar ve ark., 2015). Alum, hücre-aracılı bağışıklığı özellikle sitotoksik T hücre yanıtını yetersiz bir şekilde uyarır; bu, hücre içi parazitler ve bazı virüslere karşı aşılarla kullanımı için önemli bir dezavantajdır (Wigley ve Kaiser, 2003). Alum adjuvantlar, immunoglobulin E (IgE)-aracılı immün yanıtı provoke etme kabiliyetine sahiptir ve IgE-aracılı allerjik reaksiyonları artırmaktadır (Hilton ve ark., 2002). Buna karşılık yağ bazlı adjuvantların kullanımı, ateş ve aşırı duyarlılık reaksiyonları ile birlikte enjeksiyon bölgesinde ülserasyon ve yangıya neden olduğu için yan etkileri sebebi ile kullanımı sınırlıdır. Bu neden ile doğru adjuvantı seçmek endüstriyel üretim gereksinimleri açısından önemlidir ve hayvan refahı için kritik öneme sahiptir. Kanatlı endüstrisi, et kalitesine büyük ölçüde güvenir ve karkas hasarına yol açan enjeksiyon bölgesi reaksiyonları, et kalitesini etkileyerek ekonomik kayıplara neden olur. Bu konulardan dolayı hayvanlarda yan etkileri olmayan, etkili aşı adjuvantlarına ihtiyaç olduğu açıktır (Umar ve ark., 2015).

Bu derlemenin amacı kanatlılarda bulunan sitokinlerin başlıca türleri ve sitokinlerin yapısal ve işlevsel özellikleri ve kanatlılarda sitokinlerin potansiyel aşı adjuvantı olarak kullanımı hakkında bilgi vermektir.

## SİTOKİNLER

Sitokinler, bağışıklık sisteminin hücrelerini aktive ederek ve düzenleyerek yangı reaksiyonlarında hayati rol oynayan hücreler tarafından salgılanan proteinler ya da peptitlerdir (Umar ve ark., 2015). Bütün sitokinler, hedef hücrelerin yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla hareket ederek hücre fonksiyonlarını düzenlemektedirler (De Boever ve ark., 2010). Tarihsel olarak sitokinler, lenfositler tarafından üretilen lenfokinler, monositler

tarafından üretilen monokinler olarak ve hematopoietik koloni-uyarıcı faktör ve bağ doku büyüme faktörü olarak çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Sitokinler yapısal ve işlevsel özelliklerine göre interleukinler (IL), interferonlar (IFN), transforme büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), tümör nekrozis faktörü süper ailesi (TNFSF), koloni stimulan faktörler (CSF) olarak çeşitli şekillerde adlandırılmaktadır (Kaiser ve Staheli, 2014).

### İnterleukinler

#### İnterleukin-1 (IL-1)

IL-1'in ana kaynağı makrofajlar olmasına rağmen dendritik hücreler, T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, vasküler endotel, fibroblastlar ve keratinositler tarafından üretilir. IL-1, T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, dendritik hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve hepatositler üzerine etki eder (Tizard, 2004). Tavuklarda tanımlanmış olan dört yeni IL-1 aile üyesi bulunmaktadır. Tavuklarda bulunan bu dört yeni IL-1 ailesinin üyeleri IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1RN (reseptör antagonisti) ve IL-36RN'dir. IL-1 aile üyelerinin işlevleri tam olarak anlaşılammıştır fakat bunların hepsi ya pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar sitokinlerdir (Kaiser ve Staheli, 2014).

#### Tip 1 T yardımcı (Th1) ve Tip 2 T yardımcı (Th2) İnterleukinler

Th1 hücrelerin farklılaşması, antijen sunan myleoid dendritik hücreleri, makrofajlar, B hücreleri ve CD80 ile birlikte uyarımı aracılığı ile üretilen IL-12 tarafından yönlendirilmektedir (Tizard, 2012a). IL-12 ailesi içerisinde Th hücre yanıtını düzenleyen iki sitokinin mevcut olduğu bildirilmiştir. Bu sitokinler IL-23 ve IL-27'dir. IL-23, özellikle Th17 hücrelerinin farklılaşmasını sağlar. Bunlar her iki

pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar özelliklerine de sahiptir (Kaiser ve Staheli, 2014). IL-12 sekrete etmeyen dendritik hücreler, Th2 hücre farklılaşmasını uyarır. Th2 hücreleri, plazmasitoid dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından sunulan antijene karşı en iyi yanıtı verir. Plazmastoid dendritik hücreleri, CD86 aracılığı ile birlikte uyarımı sağlar (Tizard, 2012a). Th2 sitokin gen kümesi, tavuklarda çoklu gen aileleri için geçerli olan bir istisnasıdır. Th2 sitokinler için tavuklar, memelilerde henüz tanımlanmamış fazladan bir aile üyesine sahiptir. Bu nedenle kanonikal Th2 sitokin gen kümesi genlerinin IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 ve GM-CSF tavuk kümesi, tavuk  $\gamma$ - $\delta$  T hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen başka bir sitokin benzeri transkript olan KK34'ü kodlamaktadır. Memelilerde KK34 ortologu tanımlanmamıştır (Kaiser ve Staheli, 2014).

#### Th1-Th2 Paradigması

Memeliler, sırasıyla hücre içi veya hücre dışı patojenler ile enfeksiyonları çözen tip-1 veya tip-2 immun yolağa işlevsel olarak polarize olabilen bir bağışıklık sistemine sahiptir. Kazanılmış immun yanıtın polarizasyonu büyük ölçüde antijene özgü Th hücreler tarafından düzenlenir. Th1 hücreler tipik olarak IL-12 ve IL-18'in erken üretimi ile harekete geçirilerek IFN- $\gamma$ 'yı sekrete eder (Kaiser ve Staheli, 2014). Th1 hücreler, gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ve makrofaj aktivasyonu gibi hücre aracılı immun yanıtları uyarır. Bu durumdan dolayı Th1 hücreler, hücre içi organizmalara karşı bağışıklık oluşturmaktadır (Tizard, 2012a). Th2 hücreler ise IL-4 ya da IL-13 aracılığıyla harekete geçirilerek IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 ve IL-19'u sekrete etmektedir (Kaiser ve Staheli, 2014). Th2 hücreler tarafından sekrete edilen sitokinler B hücre proliferasyonunu ve immunoglobulin sekresyonunu



uyarır. Th2 yanıtları, helmintlere karşı gelişen bağışıklık ile ilişkilidir (Tizard, 2012a). Henüz, tavukta bu CD4 T hücre alt kümelerinden herhangi birinin varlığı resmi olarak bildirilmemiştir. Yakın zamana kadar Th1-Th2 paradigmasının varlığı memeli türlerin dışında bilinmiyordu. Memeliler ile kıyaslandığında, tavuklarda humoral immün yanıtın belirli bileşenleri mevcut değildir. Örneğin, tavuklarda IgE ve IgY (IgG'nin kanatlı homologu)'nin alt sınıfları eksik olmasına ek olarak fonksiyonel eozinofillerin mevcut olmadığı görülmektedir; eotaksinler ve eotaksin reseptörü bulunmamaktadır. L-5 mRNA ekspresyonu, Th2 yanıtları sırasında kapatılır ve Th2 ile ilişkili allerjiler kanatlılar için tanımlanmamıştır (Kaiser ve Staheli, 2014).

### İnterleukin-10 (IL-10)

İnsanlarda IL-10 ailesi farklı kromozomlar üzerinde iki küme halinde kodlanan altı üyeden oluşmuştur. IL-10, IL-19, IL-20 ve IL-24 kromozom 1 üzerinde sentenik iken IL-22 ve IL-26 kromozom 12 üzerinde senteniktir. Tavuklar, IL-10 ailesinin sadece dört üyesine sahiptir. Bunlar; kromozom 26 üzerinde bulunan IL-10, IL19 ve kromozom 1 üzerinde bulunan IL-22 ve IL-26'dır (Kaiser ve Staheli, 2014). IL-10, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarını engelleyen bir immüno-regülatör sitokindir (Tizard, 2012b). IL-19, B hücreleri ve aktive edilmiş monositler tarafından salgınır ve IL-19, IL-6 ve TNF- $\alpha$  üretimini artırmak için monositler üzerine etki eder ve monositlerin apoptozisine neden olur (Tizard, 2004). Rekombinant tavuk IL-19 ayrıca IL-4, IL-13 ve IL-10'u eksprese etmek için tavuk splenositlerini ve IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-19'u eksprese etmek için tavuk monositlerini uyarır. Tavuk IL-22, IL-10 ekspresyonunu uyarmasının yanı sıra pro-

inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve tavuk böbrek hücrelerindeki anti mikrobiyal peptitlerin, hepatositlerdeki akut faz proteinlerin ve heterofillerdeki  $\beta$ -defensinlerin ekspresyonunu uyarır (Kaiser ve Staheli, 2014). IL-26, Th1 hücreler tarafından salgınır ve keratinositler ve T hücrelerin proliferasyonunu uyarır (Tizard, 2004).

### Diğer İnterleukinler

IL-6, makrofajlar, T hücreler ve mast hücreleri tarafından oluşturulan 22 ila 28 kDa'lık sitokindir. IL-6 salgınımı bakteriyel endotoksinler, IL-1 ve TNF- $\alpha$  tarafından tetiklenir (Tizard, 2012). IL-6, tavuklarda ve memelilerde pro-inflamatuvar sitokindir. IL-17, IL-9, IL-16 ve IL-34'ün tümü tavuk genomunda kodlanmıştır ve tamamı eksprese edilmiştir (Kaiser ve Staheli, 2014). IL-9, yalnızca Th2 hücreler tarafından salgınan bir kök hücre büyüme faktörü olup T yardımcı hücrelerin ve mast hücrelerin gelişimini teşvik eder (Tizard, 2004). IL-16, hem tavuklarda hem de memelilerde dalak lenfositleri için kemotaktik aktiviteye sahip bir inflamatuvar sitokindir (Kaiser ve Staheli, 2014). İmmün yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan bir sitokin ailesi olan IL-17, T bellek hücreleri tarafından salgınır (Tizard, 2004). İnsan için tanımlanan altı IL-17 aile üyesinin beşi tavuk genomunda kolayca tanımlanır. Bunlar; IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D ve IL-17F'dir (Kaiser ve Staheli, 2014). IL-17 ailesi, fibroblastlar, keratinositler, epitel ve endotel hücreler tarafından sitokin sentezini artırır. Bu konulara ek olarak IL-17, T hücrelerin ve myeloid köken hücrelerin proliferasyonunu uyarır (Tizard, 2004).

### İnterferonlar (IFN)

İnterferonlar, lökositler ve virüs ile enfekte somatik hücreler tarafından viral enfeksiyonlara, immün

aktivasyona, yangı uyarımı ve kimyasal uyarılara yanıt olarak üretilen glikoproteinlerdir. İnterferonların iki ana sınıfı belirlenmiştir. Bunlar: virüs ile enfekte mononükleer hücreler ve virüs ile enfekte fibroblastlar tarafından üretilen Tip I interferonlar ve uyarımı takiben T lenfositlerden ve doğal öldürücü hücrelerden türetilmiş Tip II interferonlardır (Kogut, 2000). Virüs ile uyarılan Tip I IFN'un üç alt grubu tavukta memelilerde olduğu gibi IFN-alfa ( $\alpha$ ), IFN-beta ( $\beta$ ) ve IFN-lambda ( $\lambda$ ) olarak tanımlanmıştır. Tavukta hem IFN- $\alpha$  hem de IFN- $\beta$  antiviral aktiviteye sahiptir. Klonlanmış tavuk IFN- $\lambda$ , makrofaj benzeri tavuk HD11 hücre hattında nitrat üretimi ve tavuk embriyo hücrelerinde virüs korumasını uyarır (Kaiser ve Staheli, 2014). IFN-gamma ( $\gamma$ ), 17 kDa'lık bir glikoproteindir ve ana rolü Th1 hücre yanıtının düzenlenmesidir (Tizard, 2012a). IFN- $\gamma$ , hücre içi patojenler ile enfeksiyonları kontrol etmede çok önemlidir (Kaiser ve Staheli, 2014).

#### **Transforme Büyüme Faktörü- $\beta$ (TGF- $\beta$ Ailesi)**

TGF- $\beta$ , beş glikoprotein ailesinden oluşur: bunlardan üçü (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3) memelilerde bulunur iken diğer ikisi (TGF- $\beta$ 4 ve TGF- $\beta$ 5) ise tavuklarda ve Afrika pençeli kurbağalarında bulunmaktadır. TGF- $\beta$  ailesinin üyeleri, trombositler, aktif makrofajlar, nötrofiller, B hücreler ve T hücreler tarafından üretilir ve T hücrelerin, B hücrelerin, dendritik hücrelerin, makrofajların, nötrofillerin ve fibroblastların üzerine etki eder. TGF- $\beta$ , T ve B hücrelerin proliferasyonunu engeller ve T ve B hücrelerin apoptozisini uyarır (Tizard, 2012b). Memeli TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'ün doğrudan ortologları olmasına karşın memeli TGF- $\beta$ 1'in tavuk ortologu, tavuk TGF- $\beta$ 4'tür. TGF- $\beta$ 4, anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (Kaiser ve Staheli, 2014).

#### **Tümör Nekrozis Faktör Süper-Ailesi (TNFSF)**

TNFSF, yangı, apoptozis, hücre proliferasyonu ve immun sistemin uyarımının dahil olduğu hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta oldukça önemli bir role sahiptir. TNFSF proteinleri yapısal olarak homotrimerik yapıdadırlar. TNFSF üyelerinin birçoğu sitokinden ziyade uyarıma yardım eden moleküller olarak düşünülmektedir. Sitokin olarak kabul edilebilecek TNFSF üyelerinden olan TNF- $\alpha$ , lenfotoksin (LT)- $\alpha$ , LT- $\beta$  ve B hücre aktive edici faktör (BAFF)'dür (Kaiser ve Staheli, 2014). TNF- $\alpha$ , makrofajlar, mast hücreleri, T hücreleri, endotel hücreleri, B hücreleri ve fibroblastlar tarafından üretilir. TNF- $\alpha$ , bazı tümör hücrelerinin ve virüs ile enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesini tetikleyebilir (Tizard, 2004). Memelilerde, TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$  ve LT- $\beta$  büyük doku uyuşum kompleksi sınıf III (MHC sınıf III) bölgesinde birlikte kümelenmiştir. Tavuk MHC gen lokusunda veya aslında tavuk genom dizisinde bu üç TNFSF üyesinin hiçbirine dair herhangi bir kanıt yoktur. LT genleri, lenf nodüllerinin dahil olduğu ikincil lenfoid organların gelişiminde oldukça önemlidir. Tavukta lenf nodüllerinin olmamasının LT genlerinin eksikliğinden kaynaklanabileceğini düşünmek oldukça mantıklıdır (Kaiser ve Staheli, 2014). TNF- $\beta$ , tümör hücrelerini öldürür ve nötrofilleri, makrofajları, endotel hücreleri ve B hücreleri aktive eder (Tizard, 2004).

#### **Koloni Stimulan Faktör (CSF)**

Koloni stimulan faktör, hematopoietik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, olgunlaşması ve hayatta kalmasında rol oynadığı gösterilen bir büyüme faktörü ailesidir. Koloni stimulan faktörler, kemik iliği progenitör hücrelerinden farklı hücre soylarının oluşumunu uyarma yetenekleri ile adlandırılmaktadır (Kogut, 2000). Memelilerde ve

tavuklarda, üç CSF vardır. Bunlar; granülosit makrofaj (GM)-CSF (veya CSF2), granülosit (G)-CSF (veya CSF3) ve makrofaj (M)-CSF (veya CSF1)'dir. Tavuk CSF1, kültürdeki tavuk kemik iliği hücrelerinden makrofaj gelişmesini meydana getirir. Tavuk CSF2, kromozom 13 üzerinde Th2 gen kümesinde yer almaktadır. CSF2, kemik iliği ve diğer dokularda eksprese edilir ve tavuk kemik iliği hücrelerinin proliferasyonunu uyarabilir IL-4 ile kemik iliğinden dendritik hücrelerin kültürasyonuna imkan tanır. Tavuk CSF3, myelomonositik hücrelerin farklılaşmasını sağlar (Kaiser ve Staheli, 2014). Bu konuya ek olarak tavuklarda, tavuk myelomonositik büyüme faktörü (cMGF) olarak adlandırılan yalnızca tek bir CSF benzeri faktör tanımlanmış ve klonlanmıştır. Tavuk myelomonositik büyüme faktörü, kemik iliğinden mononükleer hücrelerin farklılaşmasını uyararak bir sitokindir (Leutz ve ark., 1989).

### SİTOKİN YANITININ DÜZENLENMESİ

Sitokinlerin güçlü biyolojik aktiviteleri organizma için potansiyel olarak zararlıdır. Bu durumda, aşırı sitokin yanıtlarını önlemek için çeşitli mekanizmaların mevcut olması belki şaşırtıcı değildir. Sitokin gen ekspresyonunu durduran ve böylece immun yanıtını sonlandıran sitokin sinyalleşmesinin baskılayıcıları (SOCS) ve aktive edilmiş STAT (PIAS) proteinlerinin protein inhibitörleri gibi negatif düzenleyici faktörlerin sitokin ile indüklenebilir sentezini içerir. Gen ifadesi durdurulmuş farelerle yapılan deneyler, bu negatif düzenleyicilerin eksikliğinin kronik yangıya ve hastalığa yol açabileceğini göstermiştir. Bugüne kadar memeli SOCS ve PIAS'ın kanatlı homologları karakterize edilmemiştir (Kaiser ve Staheli, 2014).

### Sitokinlerin Pozitif ve Negatif Düzenlenmesi

Mevcut yaklaşımlar, bir immunoajuvant olarak sitokinleri kullanmak için hem pozitif hem de negatif düzenlemeye odaklanmaktadır. Bu durum ile birlikte, sitokinlerin bağışıklık sistemlerini düzenlediği mekanizma, kanatlı patojenlerine karşı aşılarda geliştirilmesinde yeni hedefler sağlayabilir. Çeşitli sitokinlerin hücre içi sinyal yolları kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır ve bu yolların tümü nihayetinde sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ve nükleer faktörü-kappa B (NF-k B) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Darnell, 1997; Kumar ve ark., 2010). Janus tirozin kinaz (JAK) ve STAT, immun sitokinlerin temel araçlarıdır. Sitokin reseptör sinyalizasyonu, sitokinlerin, hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanmasıyla başlatılır, bu da JAK fosforilasyonuna izin verir. Janus tirozin kinazlar, sitoplazmada dimerleşen ve bağışıklığı düzenleyen genlerin transkripsiyonunu başlatmak için hücre çekirdeğine göç eden STAT'ı aktive eder (Kumar ve ark., 2010). Bu sinyal yollarının, negatif geri bildirim düzenlemesinin sitokin ile indüklenebilir SH2 proteinler/sitokin sinyalleşmesini baskılayıcılar (CIS/SOCS)'ı içerdiğini gösterilmiştir. (Inagaki-Ohara ve ark., 2003). Sitokin sinyallerinin uzun ömürlü olması CIS/SOCS tarafından düzenlenir. CIS, sitokin reseptörlerinin fosforile tirozin kalıntısına bağlanır ve böylece STAT kenetlenme bölgesini maskeler. Diğer yandan SOCS, kinaz engelleyici bölgesini (KIR/KEB) kullanarak substratın katalitik bölgeye erişimini engelleyerek JAK aktivitesini engeller (Kumar ve ark., 2010).

### SİTOKİNLERİN UYGULAMA YOLLARI

Kanatlı konakta sitokinlerin iletimi için dikkate alınması birincil faktör maliyettir. Son yıllarda, aşılama yöntemi olarak in-ovo aşılamasının kullanımı artmıştır, bu da daha az işlem gerektirir ve kanatlıların daha fazla strese maruz kalmasını önler. İn ovo uygulama kanatlılara bağışıklık sağlamak için aşının embriyoya amniyotik kaviteden, allantoik keseden veya damar içi enjekte edilmesini içerir (Kumar ve ark., 2010). Kanatlı türlerinde in ovo uygulamalar nispeten güvenlidir çünkü kuluçka randımanı etkilenmez (Rautenschlein ve ark., 2000). Ek olarak, rekombinant sitokinler, DNA aşılı ile birlikte kullanıldığında kas içi yolla verilir. Dahası, viral vektör teknolojisi, kümes hayvanlarında çeşitli sitokinlerin uygulamasına ve eksprese edilmesine izin vermiştir. Yeni nesil uygulama mekanizmaları, büyük kümes hayvanı popülasyonu için basit, etkili ve ucuz olan yem, su ve aerosol yoluyla aşı antijenleri ile kombinasyon halinde tek veya çoklu sitokinlerin uygulanmasına da izin verir (Kumar ve ark., 2010).

### KANATLILARDA SİTOKİNLERİN AŞI ADJUVANTI OLARAK KULLANIMI

Endojen sitokinler, immunolojik tepkilerin güçlü düzenleyicileri olduğundan, eksojen sitokinler içeren aşı formülasyonlarının gelişmiş immun yanıt verebileceğine inanmak mantıklıdır. Kanatlı hayvanlarda çeşitli sitokinlerin aşı adjuvantı olarak kullanıldığı bilimsel çalışmalar sitokinlerin yararlı etkilerini göstermiştir (Kaiser ve Staheli, 2014).

ChIFN- $\gamma$ 'nın tavuklarda antikor yanıtını geliştirme yeteneğini incelemek için bir model antijen olarak koyun kırmızı kan hücreleri (SRBC) kullanılmıştır. Spesifik patojenden ari (SPF) ve ticari etlik piliç (broiler tavuk) gruplarına hem

ChIFN- $\gamma$  olmadan hem de ChIFN- $\gamma$  ile birlikte uygulanan SRBC'nin iki farklı dozu enjekte edilmiştir. SPF tavukların, yalnızca SRBC'nin düşük bir dozu ile aşılması, tavukların yalnızca %20'sinin yanıt vermesine neden olmasına karşılık ChIFN- $\gamma$  ile birlikte uygulanması, immun yanıt verenlerin oranını %90'a çıkarmıştır (Lowenthal ve ark., 1998). Dahası yapılan farklı bir çalışma ile ChIFN- $\gamma$ 'nın adjuvant etkisi kanıtlanmıştır (Karaca ve ark., 1998). İlk kez bir kanatlı çiçeği virüsü (FPV) vektöründe eksprese edilen rekombinant tavuk tip II IFN'un, hindilerdeki aşı yanıtını artırmak için adjuvant olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Rautenschlein ve ark., 2000). Başka bir çalışma tavuklarda, ChIFN- $\alpha$ , ChIFN- $\beta$ , ChIFN- $\gamma$ 'nın kombine uygulaması tetanoz toksinine karşı antikor yanıtını artırmıştır (Schijns ve ark., 2000). ChIFN- $\gamma$ 'nın adjuvant etkisi, tavukların oral yol ile maruz kaldıktan sonra *Salmonella Enteritidis* (SE)'in bağırsak kolonizasyonuna karşı korunması için incelenmiştir. Çalışmada, grup başına 10 adet 7 haftalık tavuk, ChIFN- $\gamma$  ile birlikte kas içi uygulaması ile veya ChIFN- $\gamma$  olmaksızın iki kez inaktif SE ile aşılanmıştır ve tüm tavuklar SE ile epruvasyon yapılmıştır. ChIFN- $\gamma$ 'nın birlikte uygulanması, bağırsak kolonizasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Epruvasyondan sonraki 13. gün, organlarda SE'nin bakteri sayısının da ChIFN- $\gamma$  uygulanmış gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. Bu veriler, ChIFN- $\gamma$ 'nın SE antijeni ile birlikte uygulanmasının, antikor üretimini hızlandırmadan SE'ye karşı korumayı artırdığını göstermiştir (Takehara ve ark., 2003). Moleküler adjuvant olarak tavuk IFN-gamma (provax-chIFN- $\gamma$ ) cDNA ve bir kimyasal adjuvant olarak levamizol (LMS) ile birleştirilen NDV'nin hemagglütinin-nöraminidaz ve füzyon genlerini kodlayan bir

DNA aşısı geliştirilmiş ve letal NDV epruvasyonuna karşı korumadaki etkinliği açısından test edilmiştir. Tek başına DNA aşısı ile karşılaştırıldığında, provax-chIFN- $\gamma$  ve LMS formülasyonlu DNA aşısı, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-12 ve IL-13 ekspresyonunu artırmış ve T hücre proliferasyonu seviyelerinin gösterdiği gibi önemli ölçüde daha yüksek humoral ve hücre aracılı yanıtları indüklemiştir. Bu iki adjuvant, virulent NDV suşunun letal bir dozu ile epruvasyona karşı tavuklarda %80 koruma sağlamıştır (Yin ve ark., 2007). Rekombinant kanatlı çiçeği virüsü (rFPV) ile eksprese edilen infeksiyöz bronşitis virüsü (IBV) S1 geni (S1) ve IFN- $\gamma$ 'nın, IBV heterolog suşlarına karşı immün koruyuculuğu değerlendirilmiştir. Heterolog IBVsuşlarına karşı, rFPV-IFN- $\gamma$ -S1 aşısı ile 4 haftalık yaştaki SPF tavuklar aşılanmış gruplardaki tavuklarda, periferik kandaki CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin sayısında hızlıca bir artış olmuş ve virüsün saçılma oranında düşüş ve lezyonlarda azalma olduğu tespit edilmiştir (Shi ve ark., 2011). ChIL-1 $\beta$  mutantlarının aşı adjuvantı olarak kullanıldığı bir çalışmada ise ChIL-1 $\beta$  Q19A ve R140A olarak adlandırılan iki sitokin mutan geliştirilmiş ve tavuklarda, NDV aşısı ile Q19A veya R140A'nın intranasal yol ile tek doz uygulanarak, mutant Q19A ve R140A'nın mukozal adjuvant aktivitesi değerlendirilmiştir. Tek başına NDV aşısı ile aşılanmış tavuklar, NDV aşısı ve vahşi-tip rekombinant ChIL-1 $\beta$  ile aşılanmış tavuklar, Q19A veya R140A ile aşılanmış tavuklar ile kıyaslandığında, 1 hafta sonra önemli ölçüde artmış serum hemaglutinasyon-inhibisyon antikor titreleri ve anti NDV özgü IgA antikor düzeyleri, splenositlerden yüksek miktarda IFN- $\gamma$  salgısı ve nazal dokularda sekretör IgA'nın artmış olduğu gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2017). Benzer bir

çalışmada rChIFN- $\alpha$ 'nın SPF tavuklara içme suyu ile oral yolla uygulanması ile adjuvant etkisi gösterilmiştir (Marcus ve ark., 1999). İnaktif düşük patojeniteli avian influenza (LPAI) H9N2 aşısının etkinliğini geliştirmek için prokaryotik ekspresyon rekombinant tavuk interferon-alfa (rchIFN- $\alpha$ ) aşı adjuvantı olarak kullanılmıştır. Rekombinant (r) chIFN- $\alpha$  ile birlikte uygulanan aşı ile tavukta AI H9N2 aşısının koruyucu bağışıklığını değerlendirmek için, rchIFN- $\alpha$  ile birlikte uygulanan aşıyla tavuklar aşılanmıştır ve ardından AI H9N2 ile epruvasyon yapılmıştır. İnaktif AI aşısı ile aşılama, ölüm oranını %25'e düşürmüştür ve rchIFN- $\alpha$  ile birlikte uygulanan AI aşısı ise ölüm oranını %0'a kadar düşürmüştür. LPAI H9N2'ye karşı tavukta etkili bir aşı stratejisi oluşturmak için aşı ile birlikte rchIFN- $\alpha$  uygulamasının değerini göstermiştir (Gan ve ark., 2019).

Rekombinant tavuk IL-7 (chIL-7)'nin enfeksiyöz bursal hastalık virüsü (IBDV)'üne karşı uygulanan aşılar, aşı adjuvantı olarak kullanılabileceğini gösteren bir çalışmada, IBDV VP2 antijenik bölge geni ve chIL-7 gen vektörleri düzenlenmiş ve bu vektörler ile IBDV VP2 DNA aşısı ile SPF tavuklar aşılanmıştır. Aşılamadan sonraki 35. gün 1x10<sup>3</sup> ELD<sub>50</sub> (Embriyo Letal Doz 50) virulent IBDV ile epruvasyon çalışması yapılmıştır. ChIL-7 geninin VP2 DNA aşısı ile birlikte kullanılmasının IBDV'ye karşı özgül serum antikor titresini, lenfosit proliferasyonunu ve IFN- $\gamma$  ve IL-4 üretimini artırdığını göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında chIL-7, IBDV VP2 DNA aşısı için potansiyel aşı adjuvantı aktivitesine sahip olduğu tam olarak gösterilememiş olmasına rağmen chIL-7 geninin aşı adjuvantı olarak kullanılması için önemli deneysel bilgiler elde edilmiştir (Huo ve ark.,

2016). Başka bir çalışmada ise rekombinant chIL-7'nin farklı dozları ile aşılana SPF tavuklarda yapılan bir çalışmada, plazmid tabanlı bir chIL-7 gen ekspresyon vektörünün, tavuklarda, IBDV'ye karşı bir VP2 DNA aşısı için güçlü adjuvant aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Cui ve ark., 2018).

Tavuk IL-18 (chIL-18)'in aşı adjuvantı olarak kullanılmasının, immun sistem üzerinde uyarıcı etkisinin olduğu ve tavukları, NDV'ye karşı korumada etkili olabileceği gösterilmiştir (Su ve ark., 2011). Tavuklarda IBDV'ye karşı DNA aşılamaında chIL-18'in adjuvant etkisi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada, 14 günlük SPF civcivler, pCAGVP243, pCAGVP243-IL-18 ve pCAGGS plazmid DNA aşılı ile iki hafta aralıkla iki kez aşılanmış ve iki hafta sonra çok virulent IBDV (vvIBDV) suşu ile epruvasyon çalışması yapılmıştır. Tavuklarda IBDV'ye karşı koruyucu bağışıklık sağlamak için umut verici bir DNA aşısı adayı olduğu ve chIL-18'in, DNA aşılarının hem humoral hem de hücrel bağışıklık yanıtını verimli bir şekilde artırabilen güçlü bir adjuvant olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2013). Bu çalışmalara ek olarak ChIL-18 ve ChIL-15'in DNA aşılardaki adjuvant etkileri farklı çalışmalarda açıkça kanıtlanmıştır (Degen ve ark., 2005; Hung ve ark., 2010; Lim ve ark., 2012).

Rekombinant protein aşılarının koksidiyoza kontrol etme potansiyelini araştırmak için iki *Eimeria* sp. genleri (EtMIC2 ve 3-1E), kodlanmış proteinlerini eksprese edip saflaştırılmış ve *Eimeria* enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamak için ise sekiz tavuk sitokin geni (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 4, lenfotaktin), 3-1E parazit genini (pcDNA3-1E) taşıyan bir *Eimeria* DNA aşısı (Min ve ark., 2002) ve EtMIC2 ile IL-18, IL-16, TGF- $\beta$ 4 veya lenfotaktin ile birlikte aşı uygulaması

(Lillehoj ve ark., 2005) üzerindeki adjuvant etkileri ağırlık kaybının azaltılması, ookist saçılmasının azaltılması veya CD3 ekspresyonunun artırılması açısından değerlendirilmiş ve sitokinlerin kullanılması ile en az bir parametreyi güçlendirdiği kanıtlanmıştır (Min ve ark., 2002; Lillehoj ve ark., 2005).

Tavuk myelomonositik büyüme faktörü (cMGF), kanatlı kemik iliği öncü hücrelerinden makrofaj ve granüositlerin gelişimini artırır ancak adjuvant işlevi henüz karakterize edilmemiştir (Leutz ve ark., 1984). Canlı bir kanatlı çiçeği virüsü (fp/cMGF) aracılığı ile teslim edilen cMGF'nin in vivo biyolojik aktivitesi, önceki bir çalışmada gösterilmiştir (York, 1996). Daha yeni bir çalışmada, Marek hastalığı virüsü (MDV)'ne oldukça duyarlı olan kanatlılar fp/cMGF ile tedavi edilmiştir. Kanatlılar daha sonra ticari bir aşı ile aşılanmış, hindilerin herpes virüsü (HVT) 4 gün sonra ve sitokin tedavisinden 1 hafta sonra MDV'nin virulent (RB-1B) bir suşu ile epruvasyon yapılmıştır. Aşılanmamış kanatlılarda %100 ölüm gözlemlenir iken cMGF ile tedavi edilen aşılanmış kanatlılarda ise hiç ölüm olmamış ve buna ek olarak daha az tümör insidansı olduğu gözlemlenmiştir. MDV'ye karşı korumayı artırmak için aşılarında kullanılan viral suşlar için bir aşı adjuvantı olarak cMGF'nin potansiyel kullanımını açıkça göstermiştir (Djeraba ve ark., 2002). Bu çalışmaların çoğunda sitokinlerin adjuvant etkisi önemli olmasına rağmen bunların kanatlı aşılarda yaygın kullanımı, esas olarak yüksek üretim maliyetleri ve ek pratik engeller nedeniyle belirgin değildir (Kaiser ve Staheli, 2014).

## SONUÇ

Kanatlı hayvan endüstrisi, dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki insanların, hayvansal



protein ihtiyacını karşılayacak hayvansal et ve yumurta gibi gıdalardan yararlanması için önem arz etmekte ve her geçen gün üretim hacmi artarak gelişmektedir. Kanatlı broyler endüstrisinin karşılaştığı en büyük sorunlardan biri hastalıklardan kaynaklanan verimlilik kaybıdır. Kanatlı hayvanlar, yoğun bakım koşullarında yetiştirildiği için patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların görülme olasılığı artar. Bu nedenle hastalıkların önlenmesinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılır. Antibiyotiklerin uzun yıllar boyunca kullanılması neticesinde antibiyotiklere dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak, kanatlı hayvanlarda kullanılan aşılardaki adjuvantların olumsuz etkileri de göz önüne alındığında yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği ortadadır (Asif ve ark., 2004). Sitokinlerin, immun sistem üzerindeki etkileri bilindiğinden kanatlılarda, eksojen sitokinlerin aşı adjuvantı olarak kullanılmasını düşünmek oldukça mantıklı olacaktır. Kanatlı sitokinlerinin çeşitli bilimsel çalışmalarda aşı adjuvantı olarak kullanılması ile elde edilen bilgiler ışığında, hücresel ve humoral immun yanıtı güçlendirmeleri, hastalık etkenlerine karşı kanatlı hayvanların korunmasında doğal, etkili ve güvenilir potansiyel aşı adjuvantı olduğu kanıtlanmıştır. Ancak yapılan bilimsel çalışmalar yararlı sonuçlar ortaya koymasına rağmen kanatlı sitokinlerinin hem yapısal hem de işlevsel özelliklerinin tam olarak belirlenmesi, aşı adjuvantı olarak kullanımlarını takiben sitokinlerin, kanatlı hayvanlarda yan etkilere sebep olup olmadığının anlaşılması ve kanatlı hayvanlara uygun uygulama yollarının ve yöntemlerinin belirlenmesi için yeni bilimsel araştırmalara ve mevcut çalışmaların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Asif, M., Jenkins, K.A., Hilton, L.S., Kimpton, W.G., Bean, A.G., Lowenthal, J.W. (2004). Cytokines as adjuvants for avian vaccines. *Immunology and Cell Biology*, 82(6), 638–643.
- Chen, W.T., Chang, H.K., Lin, C.C., Yang, S.M., Yin, H.S. (2017). Chicken interleukin-1 $\beta$  mutants are effective single-dose vaccine adjuvants that enhance mucosal immune response. *Molecular Immunology*, (87), 308-316.
- Cohen, S., Bigazzi, P., Yoshida, T. (1974). Similarities of thymus-derived lymphocyte function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cellular Immunology*, (12), 150-159.
- Cui, D., Zhang, J., Zuo, Y., Huo, S., Zhang, Y., Wang, L., Li, X., Zhong, F. (2018). Recombinant chicken interleukin-7 as a potent adjuvant increases the immunogenicity and protection of inactivated infectious bursal disease vaccine. *Veterinary Research*, 49(1), 10.
- Darnell, J.J. (1997). STATs and gene regulation. *Science (New York, N.Y.)* (277 (5332)), 1630–1635.
- De Boever, S., Croubels, S., Demeyere, K., Lambrecht, B., De Backer, P., Meyer, E. (2010). Flow cytometric differentiation of avian leukocytes and analysis of their intracellular cytokine expression. *Avian Pathology*, (39), 41-46.
- Degen, W.G., van Zuilekom, H.I., Scholtes, N.C., van Daal, N., Schijns, V.E. (2005). Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine*, (23), 4212-4218.
- Djeraba, A., Musset, E., Lowenthal, J.W., Boyle, D.B., Chausse, A.M., Peloille, M., Quere, P. (2002). Protective Effect of Avian Myelomonocytic Growth Factor in Infection with Marek's Disease Virus. *Journal of Virology*, 1062-1070.
- Downing, T., Lloyd, A., O'farrelly, C., Bradley, D.G. (2010). The Differential Evolutionary Dynamics of Avian Cytokine and TLR Gene Classes. *The Journal of Immunology*, (184), 6993-7000.
- Gan, L., Tian, Y., Zhao, Y., Shan, X.Q., Zhou, W., Xia, B.B., Chen, J., Wang, M.L., Zhao, J. (2019). Enhancing immunogenicity and protective efficacy of inactivated avian influenza H9N2vaccine with recombinant chicken IFN- $\alpha$  in chicken. *Veterinary Microbiology*, (234), 77-82.
- Hilton, L., Bean, A., Lowenthal, J. (2002). The emerging role of cytokines as immunotherapeutic and adjuvants in vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85 (3-4), 119-128.
- Hung, L.H., Li, H.P., Lien, Y.Y., Wu, M.L., Chaung, H.C. (2010). Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. *Vaccine*, (28), 1148-1155.
- Huo, S., Zuo, Y., Li, N., Zhang, Y., Wang, L., Liu, H., Zhang, J., Cui, D., He, P., Xu, J., Li, Y., Zhu, X., Zhong, F. (2016). Chicken IL-7 as a potent adjuvant enhances IBDV VP2 DNA vaccine

- immunogenicity and protective efficacy. *Veterinary Microbiology*, (193), 145-155.
- Inagaki-Ohara, K., Hanada, T., Yoshimura, A. (2003). Negative regulation of cytokine signaling and inflammatory diseases. *Current opinion in Pharmacology*, 3(4), 435-442.
- Kaiser, P., Staheli, P. (2014). Avian Cytokines and Chemokines. K. A. Schat, B. Kaspars, & P. Kaiser (Dü) içinde, *Avian Immunology* (second ed b., s.). USA: Elsevier Ltd. s:189-204.
- Kalaiyarasu, S., Kumar, D., Kumar, M., Sankar, P., Elamurugan, A., Karikalan, M. (2013). Cytokines as potent therapeutic agent and vaccine adjuvant in poultry. *Research News for U (RNFU)* (10), 2250-3668.
- Karaca, K., Sharma, J., Winslow, B., Junker, D., Reddy, S., Cochran, M., McMillen, J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, (16), 1496-1503.
- Kogut M.H. (2000). Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 29(5), 395-404.
- Kumar, S., Koul, M., Rai, A. (2010). Role of Immunostimulatory Molecules in Poultry Vaccines. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(3), 235-241(7).
- Leutz, A., Beug, H., Graf, T. (1984). Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor. *The EMBO Journal*, pp.3191 - 3197.
- Leutz, A., Damm, K., Sterneck, E., Kowenz, E., Ness, S., Frank, R., Gausepohl, H., Pan, Y.C., Smart, J., Hayman, M., Graf, T. (1989). Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationship to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor. *The EMBO Journal*. 8(1), 175-181.
- Li, K., Gao, H., Gao, L., Qi, X., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Wang, X. (2013). Adjuvant effects of interleukin-18 in DNA vaccination against infectious bursal disease virus in chickens. *Vaccine*, (31), 1799-1805.
- Lillehoj, H.S., Ding, X., Dalloul, R.A., Sato, T., Yasuda, A., Lillehoj, E.P. (2005). Embryo vaccination against *Eimeria tenella* and *E. acervulina* infections using recombinant proteins and cytokine adjuvants. *The Journal of Parasitology*, 91(3), 666-673.
- Lim, K.L., Jazayeri, S.D., Yeap, S.K., Alitheen, N.M., Bejo, M.H., Ideris, A., Omar, A.R. (2012). Co-administration of avian influenza virus H5 plasmid DNA with chicken IL-15 and IL-18 enhanced chickens immune responses. *BMC Veterinary Research*, 8, 132.
- Lowenthal, J., O'neil, T.E., Broadway, M., Strom, A., Digby, M.R., Andrew, M., York, J.J. (1998). Coadministration of IFN- $\gamma$  Enhances Antibody Responses in Chickens. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, (8), 617-622.
- Marcus, P.I., van der Heide, L., Sekellick, M. (1999). Interferon Action on Avian Viruses. I. Oral Administration of Chicken Interferon-alpha Ameliorates Newcastle Disease. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19(8), 881-885.
- Meng, S., Yang, L., Xu, C., Qin, Z., Xu, H., Wang, Y., Sun, L., Liu, W. (2011). Recombinant chicken interferon- $\alpha$  inhibits H9N2 avian influenza virus replication in vivo by oral administration. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 31, 533-538.
- Min, W., Lillehoj, H.S., Burnside, J., Weining, K.C., Staeheli, P., Zhu, J.J. (2002). Adjuvant effects of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  TGF- $\beta$ 4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine*, 20, 267-274.
- Rautenschlein, S., Sharma, J.M., Winslow, B.J., McMillen, J., Junker, D., Cochran, M. (2000). Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants. *Vaccine*, (18), 426-433.
- Redmond, S., Chuammitri, P., Andreasen, C., Palic, D., Lamont, S. (2009). Chicken heterophils from commercially selected and non-selected genetic lines express cytokines differently after in vitro exposure to *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, (132), 129-134.
- Schijns, V., Weining, K.C., Nuijen, P., Rijke, E.O., Staeheli, P. (2000). Immunoadjuvant activities of *E. coli*- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN-a/b, IFN-g and IL-1b in 1-day- and 3-week-old chickens. *Vaccine*, 18, 2147-2154.
- Shi, X.M., Zhao, Y., Gao, H.B., Jing, Z., Wang, M., Cui, H.Y., Tong, G.Z., Wang, Y.F. (2011). Evaluation of recombinant fowlpox virus expressing infectious bronchitis virus S1 gene and chicken interferon-gene for immune protection against heterologous strains. *Vaccine*, (29), 1576-1582.
- Su, B., Shen, P., Hung, L., Huang, J., Yin, H., Lee, L. (2011). Potentiation of cell-mediated immune responses against recombinant HN protein of Newcastle disease virus by recombinant chicken IL-18. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141, 283-292.
- Takehara, K., Kobayashi, K., Ruttanapumma, R., Kamikawa, M., Nagata, T., Yokomizo, Y., Nakamura, M. (2003). Adjuvant Effect of Chicken Interferon-gamma for Inactivated *Salmonella Enteritidis* Antigen. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(12), 1337-1341.
- Tizard, I.R. (2004). Cytokines and the Immune System. I. R. Tizard içinde, *Veterinary Immunology* (7th ed b). W.B. Saunders Co. s. 133-143.
- Tizard, I. R. (2012). Innate Immunity: Proinflammatory and Antimicrobial Mediators. I. R. Tizard içinde, *Veterinary Immunology* (9th ed b). Saunders. s. 21-28
- Tizard, I.R. (2012a). Helper T Cells and Their Response

- to Antigen. I. R. Tizard içinde, Veterinary Immunology (9th ed. b). Saunders. s. 137-149.
- Tizard, I.R. (2012b). Regulation of Adaptive Immunity. I. R. Tizard içinde, Veterinary Immunology (9th ed. b.). Saunders. s. 209-224.
- Umar, S., Arif, M., Shah, M., Munir, M., Yaqoob, M., Ahmed, S., Khan, M.I., Younus, M., Shahzad, M. (2015). Application of avian cytokines as immuno-modulating agents. World's Poultry Science Journal, 71, 643-654.
- Wigley, P., Kaiser, P. (2003). Avian cytokines in health and disease. Brazilian Journal of Poultry Science, 5(1), 1-14.
- Yao, Q., Fischer, K.P., Arnesen, K., Tyrrell, DL., Gutfreund, K.S. (2014). Molecular cloning, expression and characterisation of Pekin duck interferon- $\lambda$ . Gene, 548, 29-38.
- Yin, J., Jin, H., Yang, F., Ding, Z., Huang, C., Zhu, Q., Wang, B. (2007). Synergistic Effects of Adjuvants Interferon-gamma and Levamisole on DNA Vaccination against Infection with Newcastle Disease Virus. Viral Immunology, 20, 288-299.
- York, J.J. (1996). In vivo effects of chicken myelomonocytic growth factor: delivery via a viral vector. The Journal of Immunology, 156(8), 2991-2997.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 33-42, 2021  
DOI: 10.38137/vftd. 908417

## KANATLI KORONA VİRÜSLERİNİN ZONOTİK POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Akın ÜNAL <sup>1a</sup>, Hakan YARDIMCI <sup>1b</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0003-4216-1200, ORCID<sup>b</sup>: 0000-0002-5994-5792

\*Sorumlu Yazar: Akın ÜNAL  
E-Posta: akinunal@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 02.04.2021  
Kabul Tarihi: 25.04.2021

### ÖZET

Bu derlemede başta tavuklar olmak üzere kanatlı hayvanlarda görülen korona virüslerin farklı yönleri ele alınarak yeni bir virüs olarak insanlarda enfeksiyon oluşturabilme potansiyeli değerlendirilmiştir. Kanatlı korona virüsleri, çok geniş bir konak çeşitliliğine sahiptirler. Son yıllarda en şiddetli salgınlar arasında yer alan COVID-19 pandemisi kanatlı korona virüslerine olan dikkat ve ilgiyi de arttırmıştır. Hem insanlarda hastalık yapan korona virüsler hem de kanatlı hayvanlarda hastalık yapan korona virüsler karşılaştırıldığında yapısal ve genomik anlamda önemli benzerlikler olduğu görülmüştür. Kanatlı korona virüslerinin genetik rekombinasyon ve mutasyonlara çok açık yeni varyant virüslerin ortaya çıkmasına sebep olduğu bilinmektedir. Virüs etrafındaki "spike proteinlerin" yapısının konak hücrelere tutunmada önemli rolünün olduğu ve bu bölgede meydana gelen rekombinasyon ve mutasyonların virüsün konak hücrelere tutunmasında değişiklik oluşturabildiği ve insan hücrelerine bağlanma potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Tüm bu benzerliklere karşın kanatlı korona virüsleriyle insanlarda hastalık yapan korona virüslerin taksonomik sınıflandırmada farklı cinslerde yer aldığını söylemek gerekir. Ayrıca günümüzde kanatlı korona virüslerinin insanlara bulaşabilirliği ile ilişkili bir rapor bulunmamaktadır. Bu potansiyel laboratuvar ortamlarında sınırlı kalmıştır. Kanatlı korona virüslerinin yakından incelenmesi ve ilgili hastalıkların izlenmesinin ardından, kontrol programlarının planlanması bu riski en az seviyede tutmayı sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Covid-19, Kanatlı, Korona virüs, Potansiyel, Zoonotik.

## EVALUATION OF THE ZONOTIC POTENTIAL OF AVIAN CORONA VIRUSES

### ABSTRACT

In this review, the different aspects of the corona viruses seen in poultry, especially chickens, were discussed and the potential of infection in humans as a new virus was evaluated. Avian corona viruses have a wide variety of hosts. The COVID-19 pandemic, which has been among the most severe outbreaks in recent years, has also increased attention and interest in avian corona viruses. When corona viruses that cause disease in humans and corona viruses that cause disease in poultry are compared, it has been observed that there are important structural and genomic similarities. It is known that avian corona viruses cause the emergence of new variant viruses that are very susceptible to genetic recombination and mutations. It has been stated that the structure of "spike proteins" around the virus has an important role in attaching to host cells, and that recombination and mutations occurring in this region can cause changes in the attachment of the virus to host cells and have the potential to bind to human cells. Despite all these similarities, it should be said that avian corona viruses and corona viruses that cause disease in humans are included in different genera in taxonomic classification. In addition, there is no report regarding the contamination of avian corona viruses to humans today. This potential has been limited in laboratory settings. Close examination of avian corona viruses and planning control programs after monitoring related diseases ensure that this risk is kept to a minimum.

**Keywords:** Avian, Corona virus, Covid-19, Potential, Zoonotic.

## GİRİŞ

İnsanlar, kanatlılar ve çeşitli hayvanları enfekte eden virüsler arasında en sıklıkla *Coronaviridae* ailesinin temsilcileriyle karşılaşmaktadır (Fehr ve Perlman, 2015). İçerisinde barındırdığı genetik materyal (genom) pozitif polariteli, tek iplikçikli RNA(ssRNA)'dan oluşmaktadır. Pozitif polariteli olmaları korona virüsleri diğer bilinen RNA virüslerinden ayıran en önemli özelliklerden bir tanesidir. Bu özelliğiyle kendi RNA'sını mRNA gibi kullanabilmektedir (Gorbalenya ve ark., 2006). Virüsün en belirgin özelliği etrafındaki değneğe benzeyen çıkıntılardır. Bu özelliğiyle mikroskop altında güneşin taç küresine (Latince: Corona) benzediği için "corona virüs" adını almıştır (Fehr ve Perlman, 2015). Ayrıca diğer RNA virüslerine benzer şekilde korona virüsler (CoV'ler) yeni virüslerin ortaya çıkmasına yol açabilecek mutasyon ve rekombinasyonlara müsait, yüksek genetik çeşitlilikle karakterizedir. Bu gibi yeni ortaya çıkmış virüslerin yeni konakları enfekte etme yeteneklerine ve potansiyeline de sahip olduğu bilinmektedir (Woo ve ark., 2009).

Geçmişte ve günümüzde meydana gelen genetik çeşitlilik sonucunda korona virüslerin sebep olduğu zoonotik hastalıklarla karşılaşmaktadır. Çin'in güneyinde ortaya çıkan SARS hastalığı, Suudi Arabistan'da tanımlanan yeni korona virüslerin sebep olduğu ve "Middle East Respiratory Syndrome" olarak adlandırılan MERS hastalığı yine yakın tarihte Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan ve 11 Şubat 2020 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 olarak adlandırılan 2019-yeni tip koronavirüsünün sebep olduğu pandeminin sorumlusu genetik olarak mutasyona ve rekombinasyona uğramış korona virüsler olarak gösterilmektedir. Evecil ve yabancı kanatlı türleri de ortaya çıkan birçok zoonotik patojen için doğal

rezervuar görevi görmekte ve halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Bu patojenlerin konak bariyerlerini aşarak diğer türleri enfekte etme potansiyeli ve buna bağlı sosyo-ekonomik problemler açısından risk oluşturma potansiyeli vardır. Bu bağlamda kanatlı hastalıklarının izlenmesi ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi yıllardan beri önemli bir konu olmuştur. Kanatlılardan bulaşan virüsler arasında en bilineni İnfluenza Tip A virüsleridir. Kanatlılar ayrıca *Salmonella* ve *Kampylobakter* gibi diğer bakteriyel enfeksiyonların yayılmasında rol oynamaktadır (Reed ve ark., 2003). Kanatlıların çeşitli patojenler için bu kadar elverişli ve mutasyonların görülebilmesi için uygun bir rezervuar olmasının başlıca nedenleri arasında kanatlı türlerinin yüksek biyolojik çeşitliliği, ekolojik özellikleri ve en önemlisi uzun mesafelere uçabilme yeteneği sayılmaktadır (Weber ve ark., 2007).

## KORONA VİRÜSÜN TAKSONOMİSİ ve YAPISI

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses = ICTV) tarafından yapılan son güncellemelere göre *Coronaviridae* ailesi; *Riboviria* alemi, *Nidovirales* takımı ve *Cornidovirineae* alttakımı içerisinde yer almaktadır. Bu aile içerisinde iki alt aile ve 46 virus türü bulunmaktadır. *Orthocoronavirinae* aile altında patojen olan virüsler yer almakta ve genom büyüklüğü 32 kb'a kadar çıkabilmektedir. Virion yaklaşık 125 nm çapındadır (Ün, 2020).

## Kanatlı Korona Virüslerinin Taksonomik Sınıflandırması

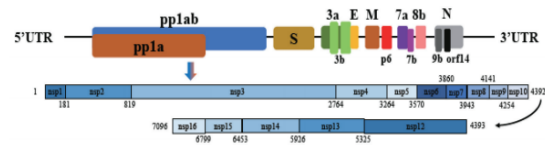
Kanatlı korona virüsleri, *Nidovirales* takımına *Coronaviridae* ailesine ve *Orthocoronavirinae* alt ailesine aittir. *Orthocoronavirinae* de sınıflandırmalar sonucunda farklı cinslere

ayrılmaktadır. Başlangıçta bu sınıflandırmanın temelini serolojik ilişkiler alırken günümüzde replikaz bölgesinin (pp1ab poliproteini ve ORF1ab geni) eşik sekans düzeyleri göz önüne alınarak revize edilmiştir. Bu ölçütlere göre *Coronavirinae* alfa-, beta-, gama-, delta- olmak üzere dört cins ayrılmaktadır (Carstens, 2019). Genel olarak alfa ve beta korona virüsleri insanları ve evcil hayvanları enfekte ederken; gama ve delta korona virüsler, deniz memelileri ve bazı etoburlarda izole edilmelerine rağmen farklı türdeki hayvanlarda da rastlanabilmektedir. Gama korona virüslerinin ana temsilcisi kanatlı korona virüsleridir. Bu taksonomide yer alan ve tavuklarda çok bulaşıcı solunum sistemi hastalığı olan infeksiyöz bronşitis hastalığından sorumlu infeksiyöz bronşitis virüsü (IBV) de bu başlıkta kendine yer bulmuştur. 2008 yılında beyaz balinalardan yeni bir korona virüs izole edilmiş ve bu korona virüsün genomunun ise gama korona virüs cinsindeki virüslerle benzer ve bu virüsün bu cinsine ait olduğuna dair ilginç bir keşifle karşılaşmıştır (Mihindukulasuriya ve ark., 2008).

### Kanatlı Korona Virüslerinin Genomik Organizasyonu

Sekans analizi sonucunda hem beta korona virüs cinsinde yer alan SARS-CoV-2'nin hem de gama korona virüs cinsinde yer alan IBV'nin 5' terminal uçlarında yapısal olmayan "açık okuma bölümleri" (ORF) mevcuttur. Ayrıca yine aynı şekilde 3' terminal uçlarındaysa yapısal proteinlere sahiptirler. Yapısal olmayan proteinlere daha yakından baktığımızda alfa- ve beta korona virüsleriyle, gama- ve delta korona virüsleri arasında bir farklılıkla karşılaşmaktadır. Alfa- ve beta korona virüslerinde yapısal olmayan integral protein sayısı 16 iken gama- ve delta korona virüslerinde NSP1 proteini eksik olduğundan 15 proteinden oluşur (Carstens, 2009).

Genomun geri kalan kısmı ise dört yapısal proteini kodlayan gen içerir: S (spike protein), E (Envelope protein), M (Membrane protein) ve N (nükleokapsit protein). Ayrıca bu genlerin arasında varlığı suşa bağlı olmak üzere düşük moleküllü yardımcı proteinler de mevcuttur. Bunlar virüsün replikasyonunda görevli olmayıp virüsün virulensinde rol oynadığına dair düşünceler hakimdir (Zhou ve Yang, 2020). Gama- ve delta korona virüslerinde bulunan yapısal olmayan proteinlerin işlevleri de büyük ölçüde bilinmemektedir ( Miłek ve ark., 2018).

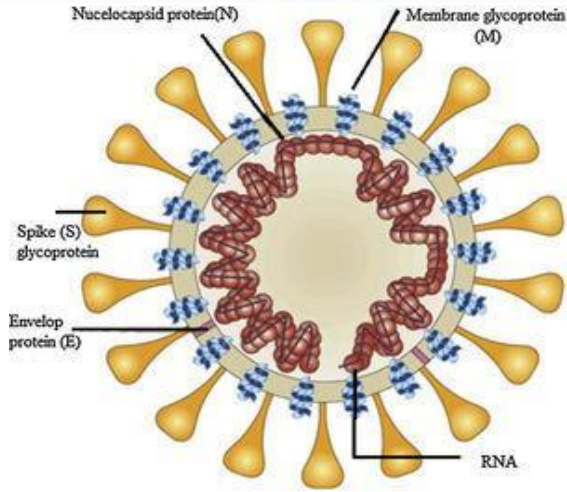


Şekil 1. Kanatlı Korona Virüslerinin Genomik Organizasyonu (Wu ve ark., 2020).

### Kanatlı Korona Virüslerinin Viral Proteinleri

"Coronavirus" adını da aldığı virion zarfı üzerinde karakteristik sivri proteinleri sergileyen güneşin taç küresine benzeyen "S" proteinlerini barındırır. Zarf, membran proteinleriyle (M) glikolize olmayan zarf proteinlerini (E) içerir. Ayrıca viral RNA'yı da çevreleyen bir dizi nükleokapsit proteini (N) mevcuttur (Cavanagh, 2007). Bu korona virüslerin sahip olduğu viral proteinlerin patojenitedeki rolleri IBV ile ilgili çalışmalardan edinilmiştir (Miłek ve ark., 2018). Virüsün yaşam döngüsünde proteinlerin rolü çok fazladır. Bir viral bağlanma proteininin belirli bir konak hücre reseptörü ile etkileşimine ve hücre zarından füzyon yoluyla genomun salınmasıyla ilişkilidir. Bu açıklanan olaydaki kilit rol ise doku ve hücre affinitesinin ve patogenezinin belirleyicisi olan S proteinlerine aittir.



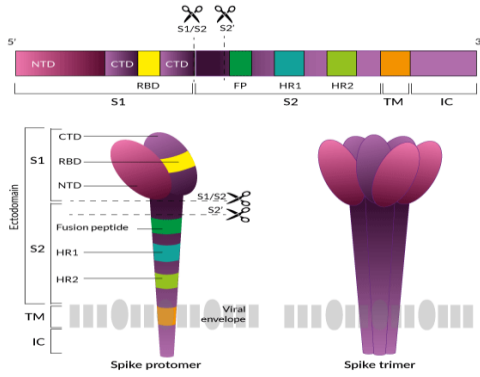


**Şekil 2.** Koronavirüsün yapısal proteinlerinin şematik görünümü (Belete, 2021).

### Kanatlı Korona Virüslerinin Spike (S) Proteinleri

S proteinleri korona virüslerin yapısal proteinlerinin en büyüğü olup taç yaprağı şeklini oluşturan karakteristik çıkıntıları vardır. Virion yüzeyinden çıkan 16-21 nm büyüklüğündeki çıkıntılar taç benzeri yapı oluşturur. Bir sinyal peptidi S proteinini endoplazmik retikuluma yönlendirir. Burada glikozilasyondan sonra, monomerler oligomerize edilerek dimerler veya trimerleri oluşturur. S proteini, oldukça bazik pentapeptid furin benzeri bir konak hücre proteazıyla bölünerek, sırasıyla yaklaşık 500 ve 600 aminoasitlik S1 ve S2 alt birimlerini oluşturur (Cavanagh, 2007). N-terminal S1 alt birimi, büyük ekto alanın bir parçasıdır ve oligomerik S proteininin baş kısmını oluşturur. C-terminal S2 alt birimi, dar bir sap oluşturan ekto alanın diğer kısmını meydana getirerek, kısa transmembran ve iç bölümü içerir (Jackwood ve ark., 2001). Korona virüs spike proteini, değişken S1 alanının konakçı hücre reseptör bağlanmasına dahil olduğu ve korunmuş S2 alanının ise virion ve hücrel membranların füzyonuna aracılık ettiği saptanmıştır (Masters ve Perlman, 2013). Tüm haritalanmış reseptör bağlanma alanları

(RBD), S1 alanı içinde çeşitli konumlarda bulunur. Alt birim S1, serotipe özgü nötralize edici antikorların indüksiyonunda yer alan epitoplara içerir, ancak çapraz koruma zayıftır ve bu serotiplerin çoğu, S1 alt biriminde amino asit seviyesinde %20-25 oranında birbirinden farklıdır. Nükleotid heterojenliği, S geninin S1 bölümünde daha yaygındır ve büyük ölçüde üç farklı hiperdeğişken bölgede (HVR) bulunur. Tam veya kısmi S1 gen nükleotid sekansının analizi, geleneksel olarak viral genetik tiplerini belirlemek için kullanılmıştır ve 50'den fazla farklı antijenik ve genetik AvCoV tipi tanınmıştır (Clavijo ve Brandao, 2021). Dış alanın S2 membran füzyon birimi, sapın kıvrımlı yapısını oluşturmak için etkileşime giren iki heptad tekrar bölgesi (HR1 ve HR2) ve varsayılan bir füzyon peptidi içerir. Endositozdan sonra, S proteinindeki konformasyonel değişiklikler endozomlarda asidik pH'a maruz bırakılarak tetiklenir (Chu ve ark., 2006), bu da viral zarfın hücrel membran füzyonuyla sonuçlanır. S1 ve S2 arasındaki etkileşim, sinerjik olarak virüs bağlanmasını, konak spektrumunu ve organ affinitesini etkileyebilir (Promkuntod ve ark., 2013). Korona virüslerin bazen şekerler bazen ise proteinler olabilen birbirinden farklı ve ortak çeşitli reseptörleri bulunur. IBV tavukların solunum sistemi için birincil affiniteye sahipken IBV varyantları böbrekler, yumurta kanalı, testisler, bursa fabricius, sekal tonsiller gibi diğer organlara da affinite gösterebilir. Bu farklılık IBV için meydana gelen gen rekombinasyonları olarak karşımıza çıkar (Cavanagh, 2005). IBV'in farklı serotiplerinin farklı organlara affinite göstererek bağlanması ya da farklı organlarda lezyonlara ve enfeksiyona sebep olmasının temeli bu susların sahip olduğu ve ihtiyaç duyduğu farklı bağlanma bölgelerinden ileri gelmektedir.



**Şekil 3.** Spike proteininin şematik yapısı (Walls ve ark., 2020).

Wickremesinghe ve ark. (2015) tarafından spike proteinleri üzerine histokimyasal temelli yaptıkları çalışmalarında spike proteinlerinin hücre bağlanmalarındaki rolü ve bu rolün konak ve organ affinitesindeki katkısını aydınlatmışlardır. IBV'nin Massachusetts suşunun S1'in aminoasitleri hücrelere  $\alpha$ -2,3-sialik asite bağımlı bir şekilde bağlandığı saptanmıştır. Nefropatojenik IBV suşlarının doku bağlanması için farklı veya ek bir reseptör kullanabileceği düşünülmektedir. Enterik korona virüsler üzerinde yapılan çalışmalar ise onların S proteinlerinin konak glikan reseptörüne bağlanması, sialik asit yapılarından bağımsız poli-LacNAcon karmaşık tipi N-glikanları tanıdığından, farklı reseptör özgüllüklerini de ortaya çıkarmıştır. Solunum IBV'leri ile enterik gama korona virüsler arasında gözlenen reseptör bağlanmasındaki farklılık, %64'e varan S1 kodlama bölgeleri arasındaki farktan çıkarılabilir (Wickremesinghe ve ark., 2015). Taksonomide delta korona virüs cinsinde yer alan virüslerin de S proteininin işlevi IBV'ye benzer olduğu görülmektedir, ancak reseptör özgüllükleri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Miłek ve ark., 2018).

Normal koşullarda Beaudette suşunun spike protein yapısı tavuk traheasına bağlanmada yeterli

değildir. Wickremesinghe ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ortaya konmuştur ki bu proteinin dış bölgesindeki S2 bölümünün çoğaltılması bu suşun tavuk traheasına bağlanmasını ciddi miktarda arttırmıştır. Massachusetts suşunun da S1 bölgesinin çoğaltılmasıyla bağlanma karakterinin ve organ affinitesini değiştirdiği görülmüştür.

Ayrıca yine Wickremesinghe ve ark. (2015) tarafından laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda S proteinin yapılarında yapılan değişikliklerin farklı memeli hayvanların ve insanların çeşitli hücrelerine bağlanabileceğini bildirmişlerdir.

### **Kanatlı Korona Virüslerinin Membran (M) Proteinleri**

Membran (M) glikoproteini, en bol bulunan zarf proteinidir ve viral zarfın şeklini tanımlar. Virüsün dışında kısa bir amino-terminal ucu ve uzun bir karboksi-terminal ucu olan üçlü bir zarf proteinidir (Rottier ve ark., 1995). Membran ya da M proteinleri polipeptid yapısındadır. Bu proteinin çok büyük bir kısmı virion membranına gömülü olarak yer almaktadır. Yaklaşık %20-30'luk bölümü ise lipid zarfının üzerinden çıkıntı yapabilir (Cavanagh, 2005).

M proteini virion organizasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu rollerden en önemlisi spike proteinlerle viral zarf arasında bir köprü oluşturmasıdır. Ayrıca diğer tüm yapısal proteinlerle etkileşime girerek organizasyon rolünü üstlenir (Cavanagh, 2005).

### **Kanatlı Korona Virüsleri Zarf (E) Proteinleri**

Zarf proteini yapısal proteinlerin en küçüğüdür. Boyutları 8.4 ila 12 kDa arasında değişen, 76-109 amino asitten oluşan kısa, bütünleşik bir proteindir. Zarf proteinin rollerine baktığımızda ilk olarak M

proteinleriyle olan sitoplazmik uzantılarının etkileşimiyle karşılaşmaktadır. Korona virüsler, viral zarfın endoplazmik retikulum-golgi ara bölgesinde (ERGIC) oluşmasıyla diğer zarflı virüslerden ayrılmaktadır (Hogue ve ark., 2008). Viral zarfın bu oluşumu M proteini tarafından yönetilse de viral partiküllerin (VLP) üretimi ve salınması için hem M hem de E proteinlerine gereksinim vardır. Dolayısıyla E proteinlerinin bir diğer rolü olarak, VLP'lerin üretilmesi ve salınması sayılabilir. Son olarak ise viral enfeksiyonların patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir (Yang ve ark., 2005; Ortego ve ark., 2007; Ye ve ark., 2007).

### Kanatlı Korona Virüslerinin Nükleokapsit (N)

#### Proteinleri

Nükleokapsit (N) proteini, genomik RNA ile kompleksler oluşturan, virion oluşumu sırasında viral

membran proteini ile etkileşime giren ve virüs transkripsiyonda kritik bir rol oynayan yapısal proteinlerden bir tanesidir (Ruch ve Machamer, 2012). Diğer önemli yapısal proteinlerin aksine, N birincil olarak korona virüs RNA genomuna bağlanarak nükleokapsiti oluşturan tek proteindir (Haan ve Rottier, 2005).

Diğer yapısal proteinlerde olduğu gibi nükleokapsit proteinlerinin de diğer proteinlerle etkileşimleri vardır. N proteinleri nükleik asite birden fazla noktadan bağlanabilmektedir. N proteini aynı zamanda replikaz kompleksinin önemli bir bileşeni olan NSP3'ü ve M proteinini de bağlar. Bu protein etkileşimleri muhtemelen viral genomun replikaz-transkriptaz kompleksine (RTC) bağlanmasına yardımcı olur. Sonuç olarak N proteini, ribonükleokapsit oluşumu ve organizasyonundan sorumludur (Anthony ve ark., 2015).

**Tablo 1.** Korona virüsün yapısal proteinlerinin boyut ve görevleri (Fehr ve Perlman, 2015).

Protein	Viriondaki Miktarı	Görevi
S	150 kDa	Konak hücre reseptörlerine tutunmadan ve tür-doku özgüllüğünden sorumludur (Fehr ve Perlman, 2015).
M	25-30 kDa	Virionun kapsit oluşumunda görev almaktadır (Fehr ve Perlman, 2015).
E	8-12 kDa	Membran geçiş aktivitelerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Fehr ve Perlman, 2015).
N	Sadece Nükleokapsitte bulunur	RNA bağlanması, kapsit oluşumundan sorumludur (Fehr ve Perlman, 2015).

### KANATLI KORONA VİRÜSLERİNİN KONAK BELİRLEYİCİLERİ

Korona virüs spike proteininin bir konağa bağlanması ve bunu izleyen konak hücre membranlarıyla virüsün kaynaşması (füzyonu), virüsün yaşam döngüsündeki ilk adımdır. İnfeksiyöz bronşitis virüsünün bağlanmasında yer alan ana faktör,  $\alpha$ -2,3-bağlı sialik asittir. Buna ek olarak, spesifik lektinler, heparin sülfat ve hücresel furinin de rol oynadığı gösterilmiştir. Korona virüslerin hücrelere bağlanmasında kritik rolün spike proteinlerine ait

olduğu söylenmektedir. Bu nedenle kanatlı hayvanlar, memeli hayvanlar ve insanlardaki reseptörlerin dağılımı ve yapısal benzerlikleri korona virüslerin bağlanması açısından oldukça önemlidir (Promkuntod ve ark., 2013).

#### Sialik Asit

$\alpha$ -2,3 bağlı sialik asit, hem hücre kültürlerinde hem de canlı hücrelerde infeksiyöz bronşitis virüsünün bağlanabileceği bir reseptördür. Sahar ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada nöraminidaz tarafından

hücrelerde bulunan sialik asitin parçalanması sonucu lektinler aracılığıyla virüsün bağlanma özelliğinin kaybolduğu belirlenmiştir. Farklı infeksiyöz bronşitis virüs suşlarının sialik asite farklı oranlarda bağlandığı ya da hiç bağlanmadığı saptanmıştır. Wickremesinghe ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada rekombinant S1 geni oluşturulmuş ve bu genin sialik asite bağlanma davranışlarının değiştiği saptanmıştır. Diğer türleri enfekte eden korona virüslere de baktığımızda yine sialik asitlerle karşılaşmaktadır.

Birçok alfa ve beta korona virüsleri için spesifik protein reseptörleri tanımlanmıştır. Domuz, kedi, köpek ve bazı insan korona virüsleri reseptör olarak aminopeptidaz N'yi (APN) kullanır. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 ise anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE2) kullanmaktadır. Ancak kanatlıları enfekte eden gama korona virüsler spesifik protein reseptörleri kullanmamaktadır. Chu ve ark. (2007) tarafından yapılan araştırma sonucunda IBV'nin APN'yi kullanabileceği ortaya konmuş olup net bir sonuca ulaşamamıştır. Ancak günümüzde hala IBV'nin spesifik protein reseptörleri kullanabilme ihtimali üzerinde durulmaktadır (Promkuntod ve ark., 2013).

### Lektinler

Jeffers ve ark. (2004) bazı konaklarda ortak lektinlerin olabileceği üzerinde durmuşlardır. Zhang ve ark. (2012) tarafından insan C-tipi lektinlerinin kullanıldığı bir çalışmaya göre, IBV'nin bir insan lektini olan L-SIGN'e bağlanabildiği ortaya konmuştur. Ancak bu bağlanma sialik asitle olan bağlanmaya göre daha az etkili olmuştur.

### Heparin Sülfat

Heparin sülfat birçok virüsün bağlanması için önemli olabilmektedir. İnfeksiyöz bronşitis hastalığının bir

suşu olan Beaudette suşu, hücrelere bağlanmak için heparin sülfat kullanmaktadır. Heparin sülfat ortadan kaldırıldığında Beaudette suşunun bağlanma yeteneğinin azaldığı görülmektedir. (Zhang ve ark., 2012). Madu ve ark. (2007) heparin sülfat ve Beadurette suşu üzerinde yaptığı çalışmada mutant bir hücre oluşturulmuş ve aynı türün mutant olmayan hücresine bağlanamayan virüsün heparin sülfat içeren mutant hücreye bağlanabildiği saptanmıştır. Dolayısıyla bu çalışma sialik asitle birlikte heparin sülfatın da kanatlı korona virüslerin bağlanmasında ciddi rolleri olduğu ve konak belirleyicisi olarak rol aldığını göstermektedir.

### Konak Proteazları

Diğer pek çok enzim gibi proteazlar da vücutta çok çeşitli mekanizmalarda görevlidir. Hem biyokimyasal hem de fizyolojik süreçlerde organizmanın işlevini direk olarak etkilerler (Alsibai, 2020). Furin, canlılarda FURIN geni tarafından kodlanan bir proteazdır. Bazı proteinler ilk sentezlendiklerinde inaktiftirler ve aktif olabilmeleri için bölümleri çıkarılmalıdır. Furin bu bölümleri ayırır ve proteinleri aktive eder (Wise ve ark., 1990). Furin, korona virüsler için iyi bilinen bir konakçı proteazdır. Yine IBV'nin Beaudette suşu infeksiyonunun aktivitesi hücrel furin ekspresyonu ile ilişkilidir (Tay ve ark., 2012). Ayrıca Furin aktivitelerinin her korona virüs de farklı olduğu bildirilmiştir. SARS-CoV 2'nin ACE2 reseptörlerine bağlanarak konak hücreye girdiği ve hücreye girdikten sonra da furin proteazı yardımıyla parçalandığı sonuç olarak viral patojenite de rol oynadığı söylenmektedir. Korona virüs temelli viral enfeksiyonların tedavisinde furin aktivitesinin değiştirilmesinin bir tedavi olarak kullanılabilmesi için araştırmalar sürmektedir (Alsibai, 2020).

## KANATLI KORONA VİRÜSLERİNİN İNSAN KORONA VİRÜSLERİYLE İLİŞKİSİ

Korona virüsler konağa bağlanmak için çeşitli reseptörleri kullanmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bazen bu reseptörler hem kanatlı hayvanlarda hem de insanlar da ortak olarak bulunabilmektedir. Wickremesinghe ve ark. (2011), tarafından yapılan çalışmada laboratuvar ortamında IBV'nin memeli hücre reseptörlerine bağlanabileceği ve memeli hayvanları enfekte edebilme potansiyeli üzerinde durulmuştur. Ayrıca Paulson ve ark. (2015), yaptığı çalışmada kanatlı gama korona virüslerinin hücrelere bağlanabilmek için bilinen tüm reseptörlerden farklı bir reseptör kullandığı ortaya konmuştur. Yine Wickremesinghe ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmayla oluşturulan rekombinant spike proteinlerin infeksiyöz bronşitis virüsünün doku ve organlara bağlanma karakterinin değiştiği görülmüştür.

Patrick ve ark. (2009), 1.541 yabani kanatlı hayvan üzerinde yaptığı geniş çalışmada daha önce tespit edilmemiş farklı kanatlı korona virüsleri saptanmıştır. Bu virüslerin bilinen memeli koronavirüsleriyle daha çok benzediği ortaya konmuştur. Dolayısıyla bu çalışmayla birlikte kanatlı korona virüslerinin tahmin edilenden çok daha geniş bir konak çeşitliliğine sahip olduğu anlaşılmıştır.

Mutasyon ve genetik rekombinasyon olayları, virüslerin evrimine katkıda bulunmaktadır. SARS-CoV'in yapılan filogenetik, genetik ve rekombinasyon çalışmaları sonucunda, IBV ile benzerlikler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Jonassen, 2006). SARS-CoV'un M ve N proteinlerinin 3' terminal ucunun kanatlı korona virüslerinden köken aldığı keşfedilmiştir. Yine hücre bağlanmasında rolü olan S proteinlerini kodlayan genin de rekombinasyon analizleri yapıldığında kanatlı korona virüslerinden köken alabileceği

saptanmıştır (Wickremesinghe ve ark., 2011). Jackwood ve ark. (2001) hindi korona virüsleri ve SARS-CoV ile ilgili yaptığı çalışmalarda, S proteinlerindeki HR bölgelerinin kökenlerinin de çok benzer olduğunu bulmuşlardır.

SARS-CoV-2 ile IBV arasında da benzerlikler vardır. 5' ucundaki ORF bölgeleri ve 3' ucundaki yapısal proteinler birbirine genetik olarak benzerlik göstermektedir. Buna rağmen bu iki virüs korona virüs sınıflandırmasında farklı sınıflarda yer almaktadır. S proteinlerinin hedef hücrelere bağlanmalarındaysa bir farklı yapılar söz konusudur. SARS-CoV-2, ACE2'yi kullanırken, IBV sialik asiti kullanmaktadır.

Paul Britton ve ark. (2005) yılında yaptığı çalışmaya göre infeksiyöz bronşitis hastalığı kontrolünün istenilen başarıya ulaşmamasının en önemli nedeni modifikasyon ve mutasyona uğramış, günümüzde de uğramakta olan suşlar olarak tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanatlı hayvanların farklı ekolojik özellikleri, çok uzun mesafelere ulaşabiliyor olmaları ve farklı yaşam şekilleri birçok virüs için ideal bir konak olmalarını sağlamaktadır. Kuş göçlerinin mevsimsel hareketleri, yoğun hayvancılık faaliyetleri, dünyadaki hızlı nüfus artışı, kültürel alışkanlıklar ve gelenekler sonucunda insanlarla kanatlı hayvanlar arasındaki temas artmıştır. Kanatlı hareketlerinin izlenmesinin zorluğu, kanatlılardaki farklı beslenme, ekolojik ve epidemiyolojik özellikler yabani kanatlılarda meydana gelen enfeksiyonların kontrolü ve izlenmesini zorlaştıran unsurlardan birkaçıdır. Korona virüsler de kanatlılar, memeli hayvanlar ve insanları enfekte etme yeteneğine sahip olan virüslerdir. Ayrıca aynı tür korona virüsün farklı türdeki kanatlıları enfekte ettiğine dair yayınlar da



mevcuttur.

Kanatlı hayvanlarda enfeksiyona sebep olan korona virüslerin insanlara ve memeli hayvanlara bulaşabilme ve bu konak belirleyicilerini aşabilme potansiyeli sadece laboratuvar ortamında sınırlı kalmaktadır. Doğal ortamlardan izole edilen kanatlı korona virüslerinin spike gen dizilimlerine dayanan sınıflandırmasında gama korona virüs sınıfında yer aldığı ve insanları enfekte eden alfa ve beta korona virüslerinden NSP1 proteinin eksik olduğu bildirilmektedir. Şimdiye kadar kanatlılardan insanlara bulaşmış korona virüs kökenli bir enfeksiyon bulunmamaktadır. Korona virüslerin mutasyona ve genetik rekombinasyonlara bu kadar müsait olmaları her zaman bir risk unsuru olarak görülmektedir. Günümüzde kanatlı korona virüsleri zoonotik olarak ciddi bir tehdit oluşturmazken kanatlı korona virüslerinin yakından izlenmesi ve genom analizlerinin yapılması bu virüslerin insanlar için önemli bir virüs olma potansiyelini sınırlandırabilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Alsibai, K.D. (2020). Expression of angiotensin-converting enzyme 2 and proteases in COVID-19 patients: A potential role of cellular FURIN in the pathogenesis of SARS-CoV2. *Med Hypotheses*, 143, 109893.
- Anthony, R., Stanley, P. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1282, 1-23.
- Belete, T.M. (2021). Review on Up-to-Date Status of Candidate Vaccines for COVID-19. *Disease. Infect Drug Resist*, 14, 151-161.
- Binns, M.M., Boursnell, M.E., Cavanagh, D., Pappin, D.J., Brown, T.D. (1985). Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J Gen Virol*, 66, 719-726.
- Britton, P., Sharon, E., Brian, D., Marc, D., Rosa, C., Cavanagh, D. (2005). Generation of a recombinant avian coronavirus infectious bronchitis virus using transient dominant selection. *J Virol Methods*, 123(2), 203-11.
- Carstens, E.B. (2009). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arc Virol*, 155, 133-146.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol*, 34, 439-448.
- Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*, 38, 281-297.
- Clavijo, N.F.S., Brandao, P.E. (2021). Emergence of Avian coronavirus genotype GI-11 in Colombia. *Braz J Microbiol*, 52(1): 455-459.
- Chu, V.C., Mcelroy, L.J., Chu, V., Bauman, B.E., Whittaker, G.R. (2006). The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells. *J Virol*, 80(7), 3180-8.
- Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*, 117, 17-37.
- Fehr, A.R., Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview Of Their Replication And Pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1282, 1-23.
- Haan, C.A.M, Rottier, P.J.M. (2005). Molecular interactions in the assembly of Coronaviruses. *Adv Virus Res*, 64:165-230
- Hogue, B.G., Machamer, C.E. (2008). Coronavirus structural proteins and virus assembly. *Nidoviruses: American Society of Microbiology (Chapter) 12*, 179-200.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H., Wade, E. (2001). Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*, 45, 366-372.
- Jeffers, S.A., Tusell, L., Gillim-Ross, E.M. (2004). CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 15748-15753.
- Jonassen, C.M. (2006) SARS/avian coronaviruses. *Dev Biol*, 126, 161-9.
- Kuo, L., Hurst, K.R., Masters PS (2007). Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein function. *J Virol*, 81(5), 2249-62.
- Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., Feng, L., Cai, X., Gu, S., Liu, M. (2005). Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *J Gen Virol*, 86, 719-725.
- Madu, I.V.C., Chu, H., Lee, A.D., Regan, B.E., Whittaker, G.R. (2007). Heparan sulfate is a selective attachment factor for the avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette. *Avian Dis*, 51, 45-51.
- Masters, P, Perlman, S. (2013) Coronaviridae. *Fields Virology*, 1, 825-858.
- Mihindukulasuriya, K.A., Wu, G., Leger, J., Nordhausen, R.W., Wang, D. (2008). Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol*, 82, 5084-5088.
- Milek, J., Katarzyna, B.D. (2018) Coronaviruses in avian species – review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *J Vet Res*, 62, 249-255.
- Mortola, E., Roy, P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett*, 576(1-2), 174-8.
- Murphy, F.A. (1994). *Virus Taxonomy - an Update*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10, R2-R3.



- Ortego, J., Ceriani J.E., Patiño, C., Plana J, Enjuanes, L. (2007). Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology*, 368(2),296–308.
- Parker, M.M., Masters, P.S. (1990). Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three domain structure for the nucleocapsid protein. *Virology*, 179, 463–468.
- Patrick, C.Y., Carol, S.F., Susanna, K.P., Carol, S.F., Kenneth, K.Y. (2009). Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J Virol*, 83(2),908-917.
- Paulson, J.C., McBride, R., Verheje, M.H., Weerts, E.A. (2015). Novel Receptor Specificity of Avian Gammacoronaviruses That Cause Enteritis. *Journal of Virology*. 8783,1098-5514.
- Promkuntod, N., Wickramasinghe, I.N., Vrieze, G., Grone, A., (2013). Contributions of the S2 spike ectodomain to attachment and host range of infectious bronchitis virus. *Virus Res*, 177(2), 127–137.
- Reed, K.D., Meece, J.K., Henkel, J.S., Shukla, S.K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme disease, influenza A, and enteropathogens. *Clin Med Res*, 1, 5–12.
- Rota, P.A., Oberste, M.S, Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P.(2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 300,1394-9.
- Rottier, P.J.M. The coronavirus membrane protein. In, Ed Siddell, S.C. Editor. *The Coronaviridae*.1st ed. Berlin Germany: Springer, 1995.pp. 115–139.
- Ruch T.R., Machamer, C.E. (2012). The coronavirus E protein: Assembly and beyond. *J Viruses*, 4(3),363–82.
- Sahar, A.E.R., Neumann, U., Herrler, G. (2009). Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 38(1),41- 5.
- Tay, F.P., Huang, M., Wang, L., Yamada, Y., Liu, D.X. (2012). Characterization of cellular furin content as a potential factor determining the susceptibility of cultured human and animal cells to coronavirus infectious bronchitis virus infection. *Virology*, 433,421-430.
- Ün, Hikmet. (2020). Coronaviridae virus family: an overall assessment. *J Adv VetBio Sci Tech*, 5(1), 1-12.
- Venkatagopalan, P., Daskalova, S.M., Lopez, L.A., Dolezal, K.A., Hogue, B.G. (2015). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *J Virology*, 478,75–85.
- Weber, T.P., Stilianakis, N. (2007). Ecologic Immunology of Avian Influenza (H5N1) in Migratory Birds. *Emerg Infect Dis*, 13(8), 1139-1143
- Wertheim, J.O., Chu, D.K.W., Peiris, J.S.M., Pond, S.L.K., Poon, L.L.M. (2013). A case for the ancient origin of coronaviruses. *J Virol*, 87, 7039–7045.
- Wickramasinghe, I.N. Tissue interactions of avian viral attachment proteins. In, Wickramasinghe, I.N Editor. *Methods Mol Biol*,1st Ed. Berlin, Germany: Springer Ed.2015. pp:155 – 163.
- Wise, R.J., Barr, P.J, Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J., Kaufman, R.J. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (23), 9378–82.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Huang, Y., Yuen, K.Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234, 1117–1127.
- Yang, Y., Xiong, Z., Zhang, S., Yan, Y., Nguyen, J., Ng, B. (2005). Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem J*, 392(1),135–43.
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 27(3), 325-328.
- Ye, Y., Hogue, B.G. (2007). Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. *J Virol*, 81(7),3597–607.
- Zhang, Y., Buckles, E., Whittaker, G.R. (2012). Expression of the C-type lectins DC-SIGN or L-SIGN alters host cell susceptibility for the avian coronavirus, infectious bronchitis virus. *Vet Microbiol*, 157,285-293.
- Zhou, P. , Yang, X.L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579,270–273.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 43-54, 2021  
DOI: 10.38137/vftd.915977

## RUMİNANLARDA METAN SALINIMINI AZALTMA STRATEJİLERİ

Gürsel GÜR<sup>1a</sup>, Hakan ÖZTÜRK<sup>1b</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0002-9095-9965, ORCID<sup>b</sup>: 0000-0003-2913-2069

\*Sorumlu Yazar: Gürsel GÜR  
E-Posta: gursel.gur@tkdk.gov.tr

Geliş Tarihi: 14.04.2021  
Kabul Tarihi: 05.05.2021

### ÖZET

Küresel ısınma gezegenimizin bugünü ve geleceği için çok ciddi bir tehdittir. Çok sayıda faktörün sorumlu olduğu küresel ısınma sorununa ruminantlar da önemli katkı sağlamaktadır. Rumen fermantasyonu sonucu oluşan önemli miktarda metan gazı (CH<sub>4</sub>) yakın gelecekte insan nüfus artışına paralel olarak ruminantların da sayısının artmasıyla çok daha etkili bir sorun olacaktır. Bu nedenle son yirmi yıldır rumen fermantasyonu sırasında metan gazı oluşumunu önlemek maksadıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır. Özellikle ikincil bitki metabolitleri, daha önceleri yem katkı maddesi olarak kullanımları yaygın olan iyonofor grubu antibiyotiklerin etkilerine benzer etkileriyle önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu derlemede rumen fermantasyonu sırasında oluşan metan gazının azaltılmasına yönelik çalışmalar incelenerek geleceğe yönelik öncelikli araştırılması gereken konular belirlenmeye çalışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Küresel ısınma, Metan, İyonofor, Rumen, Fermantasyon.

### METHANE MITIGATION STRATEGIES IN RUMINANTS

#### ABSTRACT

Global warming is a significant challenge to our planet's present and future. Although global warming is caused by a variety of factors, ruminants also contribute significantly to the challenge. As the number of ruminants grows in tandem with the human population, the considerable amount of methane gas (CH<sub>4</sub>) produced as a result of rumen fermentation will become a much more serious problem in the near future. Thus, several studies have been performed over the last two decades in order to avoid methane gas formation during rumen fermentation. Secondary plant metabolites, in particular, have a lot of potential thanks to their effects are comparable to those of ionophore group antibiotics, which were once used as feed additives. In this study, experiments aimed at mitigating methane gas produced during rumen fermentation were reviewed, and priority issues that should be explored in the future were identified.

**Keywords:** Global warming, Methane, Ionophores, Rumen, Fermentation.

#### GİRİŞ

Küresel ısınma uzun yıllar dünyamızın uzak geleceğinin bir sorunu olarak kabul edilmiştir. Hatta çoğu zaman gerçekte küresel ısınma gibi bir sorun olduğuna kuşku ile yaklaşmıştır. Günümüzde küresel ısınma yadsınamaz bir gerçektir ve çoğu bilim insanına göre küresel ısınmanın etkileri şimdiden görülmeye başlanmıştır. Küresel ısınma denince atmosfere salınan sera gazları, bu gazlar içinde de

öncelikle karbondioksit (CO<sub>2</sub>) aklı gelir. Bununla beraber metan (CH<sub>4</sub>), nitröz oksit (N<sub>2</sub>O), hidroflorür karbonlar (HFCs), perfloro karbonlar (PFCs) ve sülfürhekza florid (SF<sub>6</sub>) gibi CO<sub>2</sub>'den çok daha güçlü sera etkisine sahip gazlar da vardır. Örneğin metan gazının sera etkisi CO<sub>2</sub>'den 25 kat daha güçlü iken nitröz oksit'in etkisi ise 298 kat daha fazladır (IPCC, 2007; IPCC, 2013; Singh ve Singh, 2012; Solomon ve ark., 2007). Sera gazlarının önemli bir kısmı

tarımsal faaliyetler nedeniyle salınmaktadır. Dünya tarımsal hasılasının %40'ını hayvansal ürünler oluştururken bu üretimin önemli bir kısmının sebebi ruminantlardır. İnsan nüfusu ve gelişen ülkelerde insan başına düşen hayvansal gıda tüketim miktarının hızla artıyor olması, yıllık hayvansal gıda üretimini de artırmaktadır (FAOSTAT, 2008). Tarımsal faaliyetler, gıda üretimi ve ekonomisinde çok önemli yer tutmakla birlikte sera gazı salınımına sebep olduğundan küresel ısınmaya olan etkileri ve verim kaybı açısından tartışılmaktadır. Tarımsal faaliyetler sonucu salınan sera gazlarının üretilmesinde ruminantların payı büyüktür. Ruminantlar diğer memelilerin ya çok az sindirebildiği ya da hiç sindiremediği yapısal bitki unsurlarını sindirerek insan için çok değerli besin maddesi olan et ve süt üretirler. Bu özellikleriyle ruminantlar insan ve diğer birçok hayvan türüyle rekabete girmeden beslenebilirler (Shimojo, 2000). Ruminantlar besinleri ön midelerinde bulunan mikroorganizmalar aracılığıyla gerçekleşen fermantasyon ile sindirirler. Ancak fermantasyon sonucu küresel ısınmanın önemli sebeplerinden olan metan (CH<sub>4</sub>) ve nitröz oksit (N<sub>2</sub>O) gibi sera gazlarını da üretirler. Aynı zamanda ruminant beslenmesinde kullanılan tarım arazilerinin işlenmesi sırasında da nitröz oksit oluşumu önemli düzeydedir. Ruminal fermantasyon sonucu bol miktarda CO<sub>2</sub> de oluşur ancak esasen bitkiler atmosferden CO<sub>2</sub> çekerek yapısal bileşikleri sentezlediklerinden, bitkilerin fermantasyonu sonucu salınan CO<sub>2</sub>'in daha önce atmosferden çekilmiş olan CO<sub>2</sub> olduğu ve atmosferde sera gazı birikimine katkısı olmadığı varsayılır (Haque, 2018). Ruminantlar, tüm dünyada insan faaliyetleri sonucu salınan sera gazlarının %9'undan sorumludur. Dünya nüfusu hızla artmaktadır. Buna bağlı olarak

gıda ihtiyacını karşılayabilmek için ruminant sayısında da ciddi artış olacağı öngörülmektedir. İnsan kaynaklı metan gazı salınımının %33'ünden sorumlu olan ruminantların sayısının artmasıyla gelecek 20-30 yıl içinde insan kaynaklı metan gazı salınımının %70 oranında yükseleceği tahmin edilmektedir. Bu yükselme, küresel ısınmanın olumsuz etkilerinin şimdiden görülmeye başladığı dünyamız için büyük tehdit oluşturmaktadır. Ruminal fermantasyon sonucu metan gazı oluşumu aynı zamanda konsantre yemle beslenen ruminantlarda yemle alınan enerjinin %3'ü, kaba yemle beslenen ruminantlarda ise %12'sinin kaybı demektir (Johnson ve Johnson, 1995).

Özellikle 2000'li yıllardan sonra ruminant yetiştiriciliğinde metan gazı salınımının azaltılmasına yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla bilim insanları tarafından çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda rasyona organik asit ilavesi, bitki ekstraktları ilavesi, immünizasyon, yem kompozisyonunun modifikasyonu, rumenin defaunasyonu, metan sentezi için kullanılan hidrojenin (H<sub>2</sub>) tüketilmesi, rumen mikrobiyal dağılımının modifikasyonu ve hayvan ırkı değiştirilmesi gibi birçok yöntem denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda müspet ve menfi sonuçlara ulaşılmıştır. Bu derlemede ruminal fermantasyon sırasında sera gazı salınımının azaltılmasına yönelik çalışmalarda ulaşılan son durum gözden geçirilmiş ve bundan sonra yapılması gerekenler belirlenmeye çalışılmıştır.

### Yemin Modifiye Edilmesi

Ruminantlara verilen yemin kompozisyonu, metan üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Yem kompozisyonunda yapılan düzenlemeler ile metan

üretimi %90'a varan oranlarda azaltılabilmektedir.

### Kaba Yemin İyileştirilmesi

Vitamin, mineral, protein ve enerji bakımından zayıf olan kalitesiz kaba yemle beslemede fermantasyon performansı düşer, böylece metan üretimi yükselir. Ancak bu yemlere fermantasyon performansını yükselten vitamin, mineral ve azot kaynakları eklenirse yükselen fermantasyon performansından dolayı metan üretiminde azalma olur. Kaba yemin taze otlardan oluşması metan üretimini azaltmaktadır. Saman yerine, taze yonca, yulaf ve sorgumun tercih edilmesi ve rasyona katılan buğday samanının %30 oranında taze sorgum ile değiştirilmesi metan üretimini %33 oranında azaltmaktadır (Haque ve ark., 2001). Tanenler bakımından zengin, düşük lif, yüksek kuru madde oranı ve rumende kalış süresi kısa olan kaba yem türlerinin tercih edilmesi metan üretimini azaltmaktadır (Beauchemin ve ark., 2008). Sindirilebilirliği yüksek kaba yemin tercih edilmesi, lifli kesif yem yerine hem lifli yeme hem de daha hızlı parçalanmış nişastaya göre rumende nispeten daha zor parçalanmış nişasta oranının artırılması, çayır yerine baklagillerin tercih edilmesi, taze ya da kuru ot yerine silajın tercih edilmesi ve hatta mısırın içerdiği nişasta nispeten daha zor parçalanabilen nişasta olduğundan çayır silajının yerine mısır silajının tercih edilmesi metan üretimini %28 oranına kadar azaltmaktadır (Benchaar ve ark., 2001).

### Kesif Yem

Nişastanın fermantasyonu nişasta içeriği düşük olan yemlere nazaran propiyonik asit üretimini teşvik etmektedir. Propiyonik asit üretimi daha fazla metabolik H<sub>2</sub>'nin kullanılmasını ve rumen pH'sını düşürerek protozoonların baskılanmasını sağlar. Bu şekilde protozoonların metanojenler için daha fazla H<sub>2</sub> üretmesi önlenmiş olur. Öte yandan şeker

sindirimi nişastaya göre daha fazla metan üretimine neden olmaktadır. Şeker suda çözünmediği için rumende hızlıca fermente olmakta ve daha çok bütirik asit üretiminde kullanılmaktadır. Bütirik asit rumen pH'sının yüksek olduğu ve yeterli metabolik H<sub>2</sub>'nin de bulunduğu durumlarda metan üretimini yükseltmektedir (Chung ve ark., 2011). Rasyonda kesif yem oranı %90'a yükseldiğinde metan üretimi de %90'lara varan oranda azaltılabilir ancak bu durumda subakut ruminal asidoz (SARA) riskini göz önünde bulundurmak gerekir. Kesif yem oranı %90 olan rasyon ile besleme ruminantlarda sürdürülebilir değildir (Lovett ve ark., 2003).

### Rasyona Yağ İlave Edilmesi

Rasyona yağ ilave edilmesi yağın miktarına, formuna ve yemin kompozisyonuna göre değişiklik göstermekle birlikte her %1'lik oranda eklenen yağ için metan üretiminin %5,6 oranında azaldığı bildirilmiştir (Beauchemin ve ark., 2008). Rasyona eklenen yağ rumende yağ asitlerinin hidrojenasyonu yoluyla ortamda bulunan H<sub>2</sub>'yi kullanarak, metanojenler ve sellüloolitik bakterileri baskılayarak ve lifli besinlerin sindirimini yavaşlatarak metan üretimini %21'e varan oranda azaltabilmektedir. (Doreau ve Ferlay, 1995; Nagajara ve ark., 1997). Uzun zincirli yağ asitleri, özellikle linoleik asit, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *R. flavefaciens* gibi gram-pozitif bakterilerin hücre bütünlüğünü bozarak toksik etki gösterir (Maia ve ark., 2007). Rasyona %5 oranında doymuş bir yağ asidi olan miristik asitin eklenmesi ile metan üretimi %58,3 azalırken %7 hindistan cevizi yağı eklenmesiyle bu oran %63,8 olmuştur (Machmuller ve Kreuzer, 1999; Machmuller ve ark., 2003). Öte yandan arpa silajına yağlı tohumlardan olan keten tohumu katıldığında %37 oranında azalan metan üretimi çayır otuna keten tohumu katıldığında

değişmemiştir (Chung ve ark., 2011). Dolayısıyla rasyonun kaba yem kompozisyonu rasyona yağ ilave edildiğinde metan üretiminde meydana gelen değişiklikleri etkilemektedir. Diğer taraftan rasyona yağ eklendiğinde, rasyonun içerdiği tane yemlerin çeşidi metan üretimini değiştirmemektedir (Alvarez-Hess ve ark., 2019). Düşük kaliteli merada otlatılan süt ineklerinin yemine yağlı tohumlardan pamuk tohumu eklendiğinde süt veriminin yükseldiği, metan üretiminin ise azaldığı bildirilmiştir (Grainger ve ark., 2008).

### Rasyona Organik Asit İlave Edilmesi

Bazı araştırmacılar tarafından *in vitro* yapılan çalışmalarda organik asitlerin (fumarat ve malat) ruminal metan oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Organik asitler propiyonik asit sentezini hızlandırmaktadır. Bunun sonucunda H<sub>2</sub>, metan sentezine alternatif bir biyokimyasal yolla tüketilir. Böylece ortamda yeterli H<sub>2</sub> bulunmadığından metan sentezi azalır (Mohammed ve ark., 2004; Jalç ve Ceresnakova, 2002). Kesif yem oranı %80-90 düzeyinde olan rasyonla beslemede metan gazı üretiminin %1-2 gibi göz ardı edilebilecek düzeye düştüğü bildirilmiştir. Ancak bu durumda SARA riski ortaya çıkmaktadır. Organik asit eklenmesiyle oluşturulan alternatif H<sub>2</sub> tüketilmesi yolu ile rumen pH'sının daha fazla düşmesi önlenir. Bu durumda kesif yem oranı yüksek rasyon ile besleme sürdürülebilir olabilir (Asanuma ve ark., 1999). Bayru ve ark. (2001)'nin bildirdiğine göre organik asitlerin *in vivo* uygulanması da metan üretimini azaltmaya yönelik potansiyel taşımaktadır (Bayru ve ark., 2001). Öte yandan Beauchemin ve McGinn (2006), *in vivo* yaptıkları çalışmalarında fumarat ilavesinin metan üretimini etkilemediğini bildirmişlerdir. Organik asitlerle yapılan çalışmalar çoğunlukla *in vitro* çalışmalar olup *in vivo*

araştırmalarla çelişkili sonuçlar verdiği için bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. Organik asitlerin kullanımı, pahalı olduklarından, mera hayvancılığında uygulanması zor olduğundan ve kesif yemle beslemede etkisiz olmalarından ötürü şimdilik sahada kullanılmaları önerilememektedir.

### Rasyona Antibiyotik İlave Edilmesi

2000'li yıllara kadar hayvan verimini yükseltmek amacıyla bazı iyonofor grubu antibiyotiklerin rasyona eklenmesiyle ruminant yetiştiriciliğinde küresel ısınmaya sebep olan sera gazlarının oluşumu da önemli ölçüde baskılanmış oluyordu. İyonofor grubu antibiyotiklerin etkisi metanojen arkelerin baskılanmasından çok H<sub>2</sub> üreten Gram pozitif bakteri ve siliyalara etkiyerek H<sub>2</sub> üretimini azaltmasından kaynaklanmaktadır (McAllister ve ark., 1996). Öte yandan monensin, düşük ya da yüksek kalite kaba yemle beslemede 15 ppm/gün dozda metanojenlere etki etmezken (Sauer ve ark., 1996) 33 ppm/gün dozunda ilave edildiğinde metan üretiminin %30 azaldığı gözlenmiştir. Kesif yemle beslemede ise monensin 471 mg/gün dozda verildiğinde metan üretimine önemli sayılabilecek bir etki göstermemektedir (Guan ve ark., 2006). Yüksek gıda ihtiyacının karşılanabilmesi için gelişmiş işletmelerde ruminantlara yüksek protein ve enerjili kesif yem verilmektedir. Verimin yükseltilmesi yolunun tercih edildiği göz önünde tutulursa iyonoforlar verimin yükseltilmesinde etki gösterebilir de metan üretiminin azaltılmasında kullanışlı sayılmazlar. Ayrıca iyonofor grubu antibiyotiklerin metan üretimini baskılayan etkileri süreklilik göstermemektedir (Guan ve ark., 2006). İyonoforlar genel olarak enterik fermantasyon sonucu sera gazı salınımının azaltılmasında önemli etkilere sahip olsa da dirençli mikroorganizma gelişimi ve gıdada kalıntı

bırakma gibi çeşitli endişelerden ötürü 2006 yılından itibaren Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye’de yasaklanmıştır (Demirtas ve ark., 2020). Dünyanın diğer ülkelerinde yasak olmasa da sera gazı salınımının azaltılmasına yönelik alınan önlemler ve iyonoforların yem katkı maddesi olarak kullanımının dünya genelinde tepkiyle karşılanıyor olması, hayvancılık ve tarım sektörünü iyonoforlara alternatif ve hatta daha etkili önlemler almaya zorlamaktadır (Vet ve ark., 2015).

### Rasyona Probiyotik İlave Edilmesi

Oeztuerk (2009)’ün *in vitro* çalışmasında rasyona %0,7 oranında canlı *Saccharomyces cerevisiae* ilave edildiğinde asetik asit/propiyonik asit (A/P) oranında azalma ve fermantasyon performansında ilerleme görüldüğü bildirilmiştir. *In vitro* yapılan bir başka çalışmada yeme canlı *Saccharomyces cerevisiae* ilavesiyle toplam uçucu yağ asidi üretimi değişmezken A/P oranında belirgin azalma olmuştur (Öztürk ve ark., 2015). Propiyonik asit sentezinin yükselmesi ve fermantasyon performansının artması metan üretimini azaltan sebeplerdir. Rasyona maya eklenmesinin, propiyonik asit sentezini artırarak, protozoon sayısını azaltarak ya da hayvan verimini yükselterek metan üretimini azalttığı bildirilmektedir (Chaucheyras ve ark., 1995; Newbold ve ark., 1998; Öztürk ve ark., 2015). Lila ve ark. (2004)’nın yaptığı bir çalışmada rasyona maya eklenmesi asetojen bakterilerin asetik asit sentezini hızlandırarak ortamda bulunan metabolik H<sub>2</sub> tüketilmesi yoluyla metan sentezini baskıladığı bildirilmiştir. Rasyona maya eklenmesi rumen pH’sının stabil tutulmasına da katkı sağlamaktadır. Böylece yüksek oranda kesif yem içeren rasyon ile beslemede ruminant SARA’ya karşı daha dayanıklı olmaktadır. Probiyotikler ayrıca, metan üretiminin azaltılmasında oldukça etkili yöntem olan rasyona nitrat eklenmesi yoluyla ortaya

çıkan toksik nitritin detoksifikasyonunda rol olarak nitrit toksikasyonunu önlerler (Latham ve ark., 2018). Bu bakımdan hayvanın kendisi ve rumen mikroorganizmaları için istenmeyen toksik etkileri olan ancak metan sentezinin azaltılması bakımından önemli etkilere sahip maddelerin rasyona eklenmesi için gerekli detoksifikasyon yöntemleri ya da bileşiklerin araştırılması önemli bir araştırma alanı olarak görülmektedir. Rasyona probiyotik maya eklenmesinin metan üretiminin azaltılmasına yönelik önemli bir etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (McGinn ve ark., 2004).

### Rasyona Enzim İlave Edilmesi

Rasyona eklenen sellülaz ve hemisellülaz gibi enzimler konsantre fermantasyon ürünleri olup lif sindirimini hızlandırmaktadırlar. Rasyonda lif oranının düşük olması ya da rasyonun kolay sindirilebilir liflerden oluşması metan üretimini azaltmaktadır. Lif sindirimini hızlanması ingestanın rumende kalış süresini kısalttığından metan üretimini azaltıcı etki göstermektedir (Beauchemin ve ark., 2008). Lif sindirimini hızlanması aynı zamanda A/P oranını da azaltmaktadır (Eun ve Beauchemin, 2007). Diğer taraftan enzim ilavesi bazı çalışmalarda lif sindirimini etkilememiştir. Enzim ilavesinin lif sindirilebilirliğine etkisi rasyonun kompozisyonuna göre değişmektedir. Bu nedenle tek bir enzim formülü önerilmesi mümkün görünmemektedir (Beauchemin, 2008).

### Rumende Hidrojenin Tüketilmesi

Metan sentezi rumen ortamında öncelikli H<sub>2</sub> uzaklaştırma yolu olduğundan rumenin pH’sının stabil tutulmasında çok önemlidir. Ancak metan üretiminin biyokimyasal yolu ile rekabet edebilecek alternatif H<sub>2</sub> kullanma yöntemleri geliştirilebilirse hem metan sentezi durdurulabilir hem de H<sub>2</sub>’in



ruminantın enerji kaynağı olarak kullanabileceği organik bileşiklerin sentezinde kullanılması ve enerjinin korunması sağlanabilir (Johnson ve Johnson, 1995; Beauchemin, 2008). Rasyona doymamış yağ asitleri, nitrat ve sülfat, organik asit prekürsörleri eklemek, H<sub>2</sub>'nin alternatif ve daha rekabetçi biyokimyasal yollardan tüketilmesini sağladığından metan üretimini yavaşlatmaktadır. Bunlardan nitrat ve sülfat ekleme metan üretimini azaltsa da metan ile kaybedilen enerjiyi geri kazandıran bir yol değildir (Van Zijderveld ve ark., 2010). Diğerlerinde H<sub>2</sub>'nin biyo-enerji potansiyeli ruminant tarafından kullanılır. Ancak kısa zincirli yağ asitleri eklemek oluşan H<sub>2</sub>'nin çok küçük bir kısmını ortamdaki uzaklaştırabilir (Czerkawski, 1986). Mikrobiyal biyosentez de alternatif H<sub>2</sub> kullanma yoludur (Hungate, 1961).

### İkincil Bitki Metabolitlerinin İlave Edilmesi

Bitki ekstraktları binlerce yıldır insanlığın çeşitli patolojik durumlarda kullandığı organik bileşiklerdir. Bitki ekstraktları bitkinin yapısal bileşikler olmayıp üreme ve savunma sisteminin komponentleri olan ikincil bitki metabolitleridir. Böcekler, zararlı hayvanlar, mikroorganizmalar, diğer bitkiler ve hatta güneşin zararlı ışınlarına karşı bitkinin korunmasını sağlayan bileşiklerdir. Tanenler, saponinler, flavonoidler, organik sülfürlü bileşikler ve eterik yağlardan oluşan ikincil bitki metabolitleri birçok mikroorganizma için sitotoksik etkinliği olan bileşiklerdir. Bunlardan özellikle Gram pozitif bakterilere toksik etki gösteren bileşikler rumende metan sentezinin azaltılması için önemlidir. Çok sayıda bitki ekstraktının rumende metan salınımını azaltıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Patra, 2012). Yirminci yüzyılın ortalarına kadar kullanımları çok yaygın olan bitki ekstraktları, daha ekonomik, daha spesifik, etkili ve kolay uygulanabilir olan sentetik

ilaçların yaygınlaşmasıyla gelişmiş ülkelerde popülerliğini kaybetmiştir. Diğer ülkelerde 1980'lere kadar toplumların büyük bölümü hala ikincil bitki metabolitleri ile tedavi sağlamaya çalışırken Batılı ülkelerde doğal organik bileşiklere ilgi tekrar yükselmeye başlamış ve yan etkileri bakımından daha güvenli oldukları tartışılır olmuştur. Ancak bitki ekstraktları karmaşık birçok organik bileşik içerdiğinden elde edilmeleri, etkili ve toksik dozlarının net olarak ortaya konulması ve uygulanmaları sentetik maddelere göre daha zordur. Gıda olarak tüketilmeyen ikincil bitki metabolitlerinin farmakolojik prensipleri sentetik maddelerden farklı değildir. Kullanılacak ikincil bitki metabolitlerinin toksik dozu, farmakolojik faydası, yan etkileri, agonist ve antagonist ilişkisi tıpkı sentetik ilaçlarda olduğu gibi çalışılarak yeteri kadar araştırılmalıdır. Yaklaşık yarım asırdan bu yana bitki ekstraktlarına artan ilgi ile birlikte bu bitkilerin medikal etkinliğini ortaya koyan çalışmaların sayısı hızla artmaktadır (Greathead, 2003). Bitki ekstraktları olarak yeme, kondanse tanenler, saponinler ve esansiyel (eterik, uçucu) yağlar, ayrı ayrı ya da değişik oranlarda karışık halde ilave edilebilir.

#### a) *Kondanse Tanenler*

Tanenler beslemede önemli ikincil bitki metabolitleridir. Molekül ağırlıkları 500 ile 3000 kDa arasında değişen kompleks fenolik organik bileşiklerdir. Kondanse tanenler rumen bakterileri tarafından hidrolizle parçalanamazlar. Rumen metan üretimini azalttıkları uzun zamandır bilinmektedir (Waghorn ve McNabb, 2003). Kaba yemin, tanen içeriği daha fazla olan yonca ve baklagil türü yem bitkilerinden oluşması metan gazı azaltılmasına yönelik araştırmalarda çok iyi sonuçlar vermiştir (Tamminga ve ark., 2007). Tanenler rumende metan

gazı oluşumunu % 38-40 oranında azaltmaktadır. Ayrıca silaj yapımı sırasında silaja tanen eklemek de silajda proteolizi azaltmaktadır. Tanenler, rumende pH 3,5-7,5 arasında, proteinlerle kompleks oluşturarak proteinlerin mikroorganizmalar tarafından sindirilmesini engellerler. Böylece proteinler rumeni sindirilmeden geçerek abomazuma ulaşırlar. Tanen-protein komplekslerinin abomazumun düşük pH ortamında yapıları bozulur ve proteinleri serbest bırakırlar. Böylece tanenler proteinlerin korunarak rumende değil daha çok bağırsaklarda sindirilmesine yardımcı olurlar. Ancak tanenlerin bağırsaklara geçmesi proteinlerle tekrar kompleks oluşturma ve protein sindirimini engelleme riskini ortaya çıkarmaktadır (Ünver ve ark., 2014). Tanenlerin, rumende bulunan metanojenlerin ve protozoonların çoğalmasını ve aktivitelerini durdurarak etki gösterdiği de düşünülmektedir. Ruminantlar tanence zengin kaba yemlerle beslendiklerinde metan gazı üretimi %55 oranında azalmaktadır. Öte yandan tanenler kaba yemin sindirilebilirliği ve hayvanın gelişimini gerilettiğinden kullanımlarının yaygınlaşması için daha detaylı çalışmalar gerekmektedir (Beauchemin ve ark., 2008).

#### b) Saponinler

Saponinler bitkinin böcek ve mikroorganizmalardan korunmasında işe yarayan ve böcekler için toksik ve mikroorganizmalara karşı kuvvetli antimikrobiyal etkileri olan biyoaktif fitokimyasallardır (Mary ve ark., 1986). Saponinler rumen protozoonları ya da metanojen arkelerin sayısını azaltarak metan üretimini baskılamaktadır. Agarwal ve ark. (2006)'nın bildirdiğine göre sabun ağacı (*Sapindus mukorossi*) bitkisinin tohumlarının etanol ekstraktı, metan üretimini %96 oranında baskılamak su ve metanol ekstraktları metan üretimini sırasıyla %39,4 ve %20 oranında azaltmıştır. Bitki ekstraktlarının

elde edilme yönteminden ilave edildiği rasyonun kompozisyonuna kadar birçok faktör bu bileşiklerin rumen fermantasyonuna olan etkilerini belirlemektedir. Öte yandan her bitkiden elde edilen saponinler de aynı etkiyi göstermemektedir. Shikakai (*Acacia concinna*) bitkisinin meyve kabuklarından elde edilen saponinler protozoon sayısını azalttığı halde metan üretimine etki göstermemiştir (Patra ve ark., 2006). Bunun yanında *Sapindus saponaria* meyvelerinden elde edilen saponinlerin metan üretimini azaltıcı etkisinin defaunasyon uygulanmayan rumene eklendiğinde %14 iken defaunasyon uygulanmış rumene eklendiğinde %29 olduğu bildirilmiştir. Bu durum saponinlerin metan üretimini sınırlayıcı etkisinin tamamıyla protozoonları baskılamasından kaynaklanmadığını düşündürmektedir (Hess ve ark., 2003). Saponinlerin protozoon sayısını azalttığından rumen bakterilerinin gelişimini kolaylaştıracağı ve lif sindiriminde etkili bakterilerin gelişimini baskılayarak mayaların gelişimini hızlandıracağı göz önüne alındığında ise özellikle düşük kaliteli kaba yem ile beslemede yararlı olabileceği bildirilmiştir (Patra ve Sexena, 2009). Diğer taraftan saponinlerin rumen mikroorganizmaları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Sesbania sesban* bitkisinin yapraklarından elde edilen saponinlerin hem protozoon hem de metanojenlerin sayısını sırasıyla %50 ve %78 oranında azaltmasına rağmen metan üretiminin değişmediği gözlenmiştir. Araştırmacılar beklenmeyen bu durumu, protozoonlarla simbiyotik ilişkisi olmayan serbest metanojenlerin yüksek metabolik aktivitelerinden ötürü metan üretiminin sabit kalmasına bağlamışlardır. Aynı çalışmada bakterileri sindiren protozoon sayısının azalmasıyla *R. flavefaciens* and *F. succinogenes* gibi H<sub>2</sub> üreten bakteri sayısının yükselmesi ve böylelikle metanojenlere daha fazla H<sub>2</sub> sunulmasının serbest

metanojenlerin metan üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Goel ve ark., 2008). Bu çalışmalarda ortaya konulan sonuçlar rumende metan üretiminin protozoon sayısı ile doğru orantılı olmadığı gibi metanojen arkelerin sayısı ile de doğru orantılı olmadığını düşündürmektedir.

### c) *Esansiyel (Eterik, Uçucu) Yağlar*

Esansiyel yağlar karmaşık ikincil bitki metabolitleridir. Buharlaşma ısıları suya nazaran düşük olduğundan kolayca buharlaşabilen fenilpropanlar ve terpenlerden oluşurlar. Bu nedenle uçucu yağlar olarak da adlandırılırlar. Distilasyon metoduyla, özellikle de buhar distilasyon yöntemiyle elde edilirler (Greathead, 2003). Esansiyel yağların yaklaşık 2/3'ü mayalara inhibisyon etkisi gösterirken 1/3'ü bakterilere antimikrobiyal olarak etki eder (Cowan, 1999). Ancak bu etki daha çok beşeri farmakolojik ve toksikolojik araştırmalarla ortaya konulmuştur (Greathead, 2003). Özellikle 2000'li yıllardan sonra yapılan birçok çalışmada eterik yağların rumen fermantasyonu, mikrobiyal popülasyonlar, hayvanın verimliliği ve metan üretiminin azaltılması yönünden ruminantlara faydalı olduğu bildirilmiştir (Cieslak, 2013). Birçok bitki uçucu yağı tek başına ya da kombinasyon yapılarak ilave edildiğinde antimetanojenik etki göstermektedir. Eterik yağların etkileri çeşidine, verildiği doza ve rasyona göre değişiklik göstermektedir. Karanfil, okaliptüs, nane, kekik ve sarımsak bitkilerinden elde edilen farklı kimyasal yapılarda eterik yağların metan üretimi ve metanojenik arkelerin sayısı ve çeşidine olan etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, uçucu yağların tamamının metan üretimi ve metanojenik arkelerin sayısını, verildiği doza göre değişik düzeylerde azalttığı bildirilmiştir (Patra ve Yu, 2014). Uçucu yağlar, bitkinin farklı kısımlarında bulunan ve

anethole, limonene, capsaicin, eugenol, carvacrol, geraniol ve thymol gibi biyoaktif antimikrobiyal özellikte bileşiklerle bitkinin savunmasında rol alır. Uçucu yağlar hidrofobik ve lipofilik yapılarından ötürü Gram pozitif bakterilerin hücre duvarını geçerek hücre membran yapısını bozar. Böylece membran iyon geçirgenliğini değiştirerek antimikrobiyal etki gösterir. Uçucu yağların antibakteriyel etkinliği kimyasal kompozisyonuna göre değişiklik gösterir. Uçucu yağların daha çok Gram pozitif bakterilere antibakteriyel etki gösterdiği bilinmekle birlikte Gram negatif bakterileri de bir miktar etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle eterik yağların biyoaktif bileşiklerinin rumen mikroorganizmalarına yönelik minimal etkili dozu ve toksik dozları ayrı ayrı araştırılarak antimikrobiyal spektrumun belirlenmesi ve hangi aktif maddenin hangi dozda kullanılacağına ortaya konması gereklidir (Demirtaş ve ark., 2018). Eterik yağların aynı bitkinin yetiştiği yöreye, toprağa, ısı ve nem değerlerine, kullanılan bitki kısmına ve elde edilmiş yöntemine göre kompozisyonu ve saflığı değiştiğinden standardizasyonu oldukça güçtür (Cobellis ve ark., 2016). Ayrıca eterik yağlar hoş kokmadıklarından hayvanın yem tüketimini etkilemelerini önlemek için korunmuş olarak yeme eklenmeleri tavsiye edilmektedir (Demirtaş ve ark., 2018).

### **Rumen Mikrobiyal Dağılımının Değiştirilmesi**

Rumende mikroorganizma dağılımını, halojenize metan analogları (Öztürk, 2007), rekabetçi mikroorganizmalar, rumen mikroorganizmalarını hedef alan spesifik mikroorganizmalar ya da immünizasyon yoluyla düzenleyerek metan üretimini azaltmak mümkündür (Eckard ve ark., 2010). Metanojen arkelere karşı geliştirilen aşılarda metan üretiminin azaltılabileceği bildirilmiştir (Öztürk,

2007). Ancak rumende bulunan metanojen mikroorganizma çeşitliliği belirli bir suş ile sınırlı olmayıp yetiştiriciliğin yapıldığı bölge ve beslemede kullanılan rasyonun kompozisyonuna göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle tüm dünyada kullanılabilir bir aşı geliştirmek oldukça zordur (Wright ve ark., 2004). McAllister ve Newbold (2008) tarafından metanojenlerin hücre membran bileşenlerini hedef alan bir aşı geliştirmenin metan üretiminin azaltılmasında daha etkili olabileceği bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından rumen ortamına bakteriyofaj ya da bakteriyosin üreten mikroorganizmaların uygulanması ya da rumen ortamında bulunan hidrojeni, propiyonik ve asetik asit gibi metandan farklı fermantasyon ürünlerinin sentezinde kullanan mikroorganizmalara yönlendirerek metan üretiminin azaltılması önerilmiştir (McAllister ve Newbold, 2008). Ancak önerilen bu yöntemler için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Metan üretimi yerine ortamdaki H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'i kullanarak asetik asit üreten asetojenler başarılı olsaydı hayvanın enerji kazancı %4-15 daha yüksek olabilirdi. Ancak asetojenlerin asetojenezis ile hidrojen rekabetinde henüz başarılı sonuçlar alınmadığından bu yöntem hala sahada kullanılabilir değildir (Haque, 2018). Diğer taraftan aminokloral, kloroform, trikloroetiladipat, kloralhidrat, alfa-siklodekstrin, trikloroasetamid, 9,10-antrakuinon, 2-bromoetan sülfonik asit ve bromoklorometan gibi halojenize metan analogları metan üretimini azaltmakla birlikte kullanışlı olmadıkları gibi bazı zararlı yan etkileri de bulunmaktadır. Ayrıca metanojenler bu tür kimyasallara direnç geliştirebilmektedir. Bu nedenle ruminant beslenmesinde kullanılmaları sürdürülebilir değildir (Öztürk, 2007).

Rumende bulunan protozoonlardan özellikle entodiniomorf protozoonlar bakterileri sindirirler

ancak özellikle metanojen arkeler sindirilmez ve protozoonun simbiyonunda yaşamaya devam eder. Protozoonun metabolizması sırasında ortaya çıkan hidrojenin metanojen tarafından metan üretiminde kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılması protozoon ile metanojen arasında simbiyotik bir işbirliğini kurar. Protozoon metanojene hidrojen sağlarken hidrojenin ortamdaki uzaklaştırılması protozoon için fermantasyon faaliyetlerinin devamlılığı demektir. Bu nedenle rumende bulunan protozoonlardan özellikle siliatların yüzeyi ya da simbiyonlarına yerleşmiş metanojenler sayesinde metan gazı üretimine, yemin kompozisyonuna göre değişmekle birlikte %37'ye varan oranda katkı sağlarlar (Newbold ve ark., 2015). Rumende protozoonların sayısının azalması, hem siliatların yüzeyinde ya da endosimbionları içinde yerleşmiş metanojenler ortadan kalktığından, hem de protozoon kaynaklı hidrojen üretimi durduğundan metan üretimini azaltmaktadır (Kamra, 2005). Protozoonların rumenden uzaklaştırılması metan gazı üretimini azaltıyor olsa da rumende fermantasyon olaylarında bozulma ve hayvanın performansında düşüş olabileceğinden en kullanışlı seçenek değildir (Haque, 2018).

### Hayvan Irkının Değiştirilmesi

Verimi düşük hayvanların ayrılması, daha yüksek verimli ve daha az metan gazı üreten hayvanların yetiştirilmesi metan gazı üretiminin azaltılması amacıyla önerilen ıslah yöntemleridir. Metan üretimi hayvan sayısı ile doğru orantılı olduğundan düşük verimli hayvanların sürüden ayrılması ve yerine daha verimli hayvanların alınması birim verim başına düşen metan üretim miktarını azaltmaktadır. Metan üretimini azaltmaya yönelik yapılan birçok araştırmada değişik sonuçlar ortaya konmuştur. Bu nedenle bazı araştırmacılar, bunun nedeninin

fenotipik özellikler ve kalıtsal özelliklerden kaynaklanabileceğinden yola çıkarak daha az metan gazı üreten hayvanların yetiştirilmesini önermişlerdir, ancak bunun işe yaramayabileceğini bildiren araştırmacılar da vardır (Pinares-Patiño ve ark., 2003; Clark ve ark., 2005; Eckard ve ark., 2010). Öncelikle metan üretiminin hayvan ırklarıyla ilişkisinin olup olmadığı detaylı bir şekilde araştırılmalıdır.

### SONUÇ

Küresel ısınmanın önemli aktörlerinden olan ruminantlardan metan gazı salınımını azaltmak amacıyla çeyrek asırdan uzun zamandır bilim insanları çalışmalar yapmaktadır. Bu maksatla yemin modifiye edilmesi, rumen mikrobiyal dağılımının değiştirilmesi, hayvan ırkının değiştirilmesi vb. birçok yöntem önerilmiştir. Bu yöntemlerden bir ya da birkaçı yalnız başına veya birlikte uygulandığında yüksek etkinliği, düşük maliyetli ve sürdürülebilir olmasıyla ruminantlarda sera gazı salınımının azaltılmasında potansiyel taşımaktadır. Bunun yanında sentetik kimyasalların insan kullanımında olduğu gibi hayvan yetiştiriciliğinde de kullanımının azaltılarak doğal fitokimyasalların yaygınlaştırılmasına çalışılmaktadır. Son yıllarda ikincil bitki metabolitlerinin ruminal sera gazı salınımının azaltılmasında yüksek potansiyel taşıdığı görüldüğünden bilim insanları tarafından artan ilgiyle araştırmalar sürdürülmektedir. İkincil bitki metabolitleri düşük yan etkisi, düşük maliyeti ve yüksek antimetanojenik etkinliği ile önerilen yöntemler arasında öne çıkmaktadır. Bazı bitkilerden elde edilen ikincil bitki metabolitlerinin rumen fermantasyonu ve metan sentezinin azaltılmasına yönelik olumlu etkileri gösterilmekle birlikte bu ürünlerin çok karmaşık bileşiklerden oluşması spesifik olarak belirli mikroorganizmalara olan

etkilerini anlamayı güçleştirmektedir. Bu nedenle ortaya konulan yararlı ve toksik etkilerin, hangi bileşiğin hangi dozda etkisi olduğunun belirlenmesi ikincil bitki metabolitlerinin daha etkin kullanımı için gereklidir. İkincil bitki metabolitleri tıpkı sentetik kimyasallarda olduğu gibi doza bağlı olarak ilaç ya da toksik etkilidir. Bunlar çok sayıda karmaşık bileşiklerden oluştuklarından ayrı ayrı etkinliklerinin ve ilaç-zehir ilişkisinin belirlenmesi uzun ve zorlu araştırmaların yapılmasını gerektirse de farmakolojik ve toksikolojik sonuçları itibariyle yüksek potansiyel taşımaktadır.

### KAYNAKLAR

- Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaudhary, L.C., Patra, A.K. (2006). Effect of *Sapindus mukorossi* extracts on in vitro methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. *Journal of Applied Animal Research*, 30(1), 1-4.
- Alvarez-Hess, P.S., Williams, S.R.O., Jacobs, J.L., Hannah, M.C., Beauchemin, K.A., Eckard, R.J., Wales, W.J., Morris, G.L., Moate, P.J. (2019). Effect of dietary fat supplementation on methane emissions from dairy cows fed wheat or corn. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2714-2723.
- Asanuma, N., Iwamoto, M., Hino, T. (1999). Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 780-787.
- Bayaru, E., Kanda, S., Kamada, T., Itabashi, H., Andoh, S., Nishida, T., Ishida, M., Itoh, T., Nagara, K., Isobe, Y. (2001). Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility of cattle fed roughage alone. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 72(2), 139-146.
- Beauchemin, K.A., Meginn, S.M. (2006). Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of animal science*, 84(6), 1489-1496.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'mara, F., Mcallister, T.A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 21-27.
- Benchaar, C., Pomar, C., Chiquette, J. (2001). Evaluation of diet strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*, 81, 563-574.
- Chung, Y.H., He, M.L., Meginn, S.M., Mcallister, T.A., Beauchemin, K.A. (2011). Linseed suppresses enteric methane emissions from cattle fed barley silage, but not from those fed grass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 321-329.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., Gouet, P. (1995). Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on



- zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Current Microbiology*, 31(4), 201-205.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal*, 7, 253-265.
- Clark, H., Pinares-Patiño, C., De Klein, C. (2005). Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. *Grassland. A Global Resource*, 279-293.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Czerkawski, J.W. (1986). *An Introduction to Rumen Studies*. Exeter: Pergamon Press.
- Demirtaş, A., Öztürk, H., Pişkin, İ. (2018). Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation, *Ank Univ Vet Fak Derg*, 65 (2), 213-217.
- Demirtaş, A., Musa, S.A.A., Pekcan, M., Salgirli Demirbas, Y., Piskin, I., Emre, B., Ozturk, H., Toprak, N.N. (2020). Effects of Cleavers (*Galium aparine*) and Yarrow (*Achillea millefolium*) Extracts on Rumen Microbial Fermentation in In-vitro Semi-Continuous Culture System (RUSITEC). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(3).
- Doreau, M., Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livestock Production Science*, 43(2), 97-110.
- Eckard, R.J., Grainger, C., De Klein, C.A.M. (2010). Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science*, 130(1-3), 47-56.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A. (2007). Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristic. *Animal Feed Science and Technology* 132, 298-315. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.02.014.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2008). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 770-777.
- Grainger, C., Clarke, T., Beauchemin, K.A., MCGinn, S.M., Eckard, R.J. (2008). Supplementation with whole cottonseed reduces methane emissions and increases milk production of dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 73-76.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H., Krause, D.O. (2006). Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, 84, 1896-1906.
- Haque, N., Saraswat, M.L., Sahoo, A. (2001). Methane production and energy balance in crossbred male calves fed on rations containing different ratios of green sorghum and wheat straw. *Indian Journal of Animal Sciences*, 71, 797-799.
- Haque, M.N. (2018). Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of animal science and technology*, 60(1), 15.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Diaz, T.E., Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: Effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 703-713.
- Hungate, R.E., Mah, R.A., Simesen, M. (1961). Rates of production of individual volatile fatty acids in the rumen of lactating cows. *Appl Microbiol*, 9, 554-561.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Jalc, D., Ceresnakova, Z. (2002). Effect of plant oils and malate on rumen fermentation in vitro. *Czech J Anim Sci*, 47, 106-111.
- Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci. India*, 89: 124-135.
- Latham, E.A., Pinchak, W.E., Trachsel, J., Allen, H.K., Callaway, T.R., Nisbet, D.J., Anderson, R.C. (2018). Isolation, characterization and strain selection of a *Paenibacillus* species for use as a probiotic to aid in ruminal methane mitigation, nitrate/nitrite detoxification and food safety. *Bioresource Technology*, 263, 358-364.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S., Itabashi, H. (2004). Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*, 82(6), 1847-1854.
- Lovett, D.K., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J. (2003). Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livestock Production Science*, 84, 135-146.
- Machmuller, A., Kreuzer, M.C.J.A.S. (1999). Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 79(1), 65-72.
- Machmuller, A., Soliva, C.R., Kreuzer, M. (2003). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90(3), 529-540.
- McAllister, T.A., Cheng, K.J., Okine, E.K., Mathison, G.W. (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), 231-243.
- McAllister, T.A., Newbold, C.J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 7-13.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D. (2004). Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J Anim Sci*, 82, 3346-3356.



- Maia, M.R., Chaudhary, L.C., Figueres, L., Wallace, R.J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 303-314.
- Mary, W., Crombie, L., Crombie, L. (1986). Distribution of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots: Their fungicidal activity towards 'take-all' fungus. *Phytochemistry*, 25(9), 2069-2073.
- Mohammed, N., Lila, Z.A., Ajisaka, N., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., Itabashi, H. (2004). Inhibition of ruminal microbial methane production by  $\beta$ -cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88(5-6), 188-195.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 523-632). Springer, Dordrecht.
- Newbold, C.J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., Mcewan, N.R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1313.
- Oeztuerk, H. (2009). Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation in vitro. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18(1), 142-150.
- Öztürk, H. (2007). Küresel ısınmada ruminantların rolü. *Vet Hek Der Derg*, 78(1), 17-21.
- Öztürk, H., Demirbaş, Y.S., Aydın, F.G., Pişkin, İ., Ünler, F.M., Emre, M.B. (2015). Effects of hydrolyzed and live yeasts on rumen microbial fermentation in a semicontinuous culture system (Rusitec). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(5), 556-559.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291.
- Patra, A.K., Saxena, J. (2009). The effect and mode of action of saponins on microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22, 204-219.
- Patra, A.K. (2012). An overview of antimicrobial properties of different classes of phytochemicals. *Dietary Phytochemicals and Microbes*, 1-32.
- Patra, A.K., Yu, Z. (2014). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 897-905.
- Parry, M., Parry, M.L., Canziani, O., Palutikof, J., Van Der Linden, P., Hanson, C. (2007). Climate change 2007-impacts, adaptation and vulnerability: Working group II contribution to the fourth assessment report of the IPCC (Vol. 4). Cambridge University Press.
- Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Barry, T. N., Holmes, C.W. (2003). Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 140(2), 227-233.
- Sauer, F.D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J.K.G., Jackson, H.A., Lee, A.J., Chen, S. (1998). Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 76(3), 906-914.
- Singh, B.R., Singh, O. (2012). Study of impacts of global warming on climate change: rise in sea level and disaster frequency. *Global warming-impacts and future perspective*.
- Shimojo, M., Bungo, T., Imura, Y., Tobisa, M., Furuse, M., Masuda, Y., Yasukatsu, Y., Yutaka, N., Tao, S., Muhammad, Y., Goto, I. (2000). Basic avoidance of food competition among ruminants, non-ruminants and humans-A simple analytic description. *Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University*, 44(3/4), 293-298.
- Stocker, T. (2014). *Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge university press.
- Tamminga, S., Bannink, A., Dijkstra, J., Zom, R.L.G. (2007). Feeding strategies to reduce methane loss in cattle. *Animal Sciences Group*, 34.
- Ünver, E., Okur, A.A., Tahtabiçen, E., Kara, B., Şamli, H.E. (2014). Tannins and their impacts on animal nutrition. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2(6), 263-267.
- Waghorn, G.C., Mcnabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 383-392.
- Wright, A.D.G., Kennedy, P., O'neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., Pimm, C.L., Klein, L. (2004). Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine*, 22(29-30), 3976-3985.
- Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W.J.J., Apajalahti, J.A., Newbold, J.R., Dijkstra, J., Leng, R.A., (2010). Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J. Dairy Sci*, 93, 5856-5866. Doi: 10.3168/jds.2010-3281.
- Vet, L.G.R.P.M., Vet, F.S.M.M., Vet, MM. C.M., Júnior, R.G., Vet, T.R.T.M., Pharm, L.G.R., St, M.V. (2015). Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review/Estratégias de mitigación de metano entérico en rumiantes: revisión de literatura/Estratégias de mitigação de metano entérico em rumiantes: revisão de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28(2), 124.