

JOURNAL OF ADVANCES IN
VETBIO SCIENCE AND TECHNIQUES



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

VET

B



J Adv VetBio Sci Tech – Volume 6(3) – December 2021



Year 2021

Volume 6

Issue 3

EDITORIAL ARCHIVE

Editors-in-Chiefs

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

Associate Editor

Caner ÖZTÜRK, University of Aksaray

Section Editors

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

Editorial Board

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

Names are listed alphabetically

August 31, 2021 / Copyright© VetBio

DergiPark
AKADEMİK

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

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

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

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

e-mail: vetbiojournal@gmail.com
Web Page: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>
Phone: 05536203468

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



CONTENTS

	Pages
Research Articles	
Subakut malathion uygulamasının oksidatif stres biyobelirteçlerine etkisi † Hacı Ahmet DEVECI, Gökhan NUR, Pınar AKSU KILIÇLE	193-201
Endoparasite investigation in some fish species with high economic value obtained from Canakkale, Turkey † Ruhay ALDIK, Fikret ÇAKIR, Özlem TONGUÇ YAYINTAŞ, Uğur ALTINAĞAÇ	202-210
Evaluation of the effect of birth type on the blood gas and Apgar scores of Aleppo goat newborn kids † Tuğra AKKUŞ, Ömer KORKMAZ, Birten EMRE, Abuzer K. ZONTURLU, Pelin F. POLAT DİNÇER, Ömer YAPRAKCI	211-219
Tatlı su midyelerinin (<i>Unio terminalis</i>) erkek ve dişi bireylerinde kondisyon faktörünün boy guruplarına göre incelenmesi † Hülya ŞEREFLİŞAN	220-227
Seroepidemiological survey of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) infection amongst domestic ruminants in Adana province, East Mediterranean, Turkey † Bilge Kaan TEKELIOĞLU, Emre OZAN, Armağan Erdem ÜTÜK, Ayca Hatice ATLL, Harun ALBAYRAK, Mabrouk ELSABAGH, Mahmut Ali GÖKÇE, Nevin TURUT, Omer Memduh ESENDAL, Mehmet ÇELİK	228-238
The effect of organochlorine insecticides on honey bee (<i>Apis mellifera</i>) deaths seen in Adana region † Mansur Seymen SEĞMENOĞLU	239-242
Evaluation of the antioxidant potential of the mad honey collected from the black sea region in Turkey † Efe KURTDEDE, Berk BARAN	243-250
Plasma T ₃ (Triiodothyronine) and T ₄ (Thyroxine) hormone levels as reference values in rehabilitated healthy gray herons (<i>Ardea cinerea</i>) † Evrim SÖNMEZ	251-257
Serum iron, copper and zinc concentrations in neonatal lambs naturally infected with <i>Cryptosporidium parvum</i> † Ceren DİNLER AY	258-264
Heat stress, intestinal barrier disruption and calves: multidisciplinary perspective field study † Deniz ALIÇ URAL, Songül ERDOĞAN, Hasan ERDOĞAN, Kerem URAL	265-269

Koçlarda spermaya katılan CAPE'in (Kafeik asit fenil ester) dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri 👤 Mustafa GÜNDOĞAN, Deniz YENİ, Fatih AVDATEK, Ömer HAZMAN	270-277
Kidney tissue selenium levels of <i>Toxocara Canis</i> infected mice given <i>Nigella Sativa</i> 👤 Serkan SAYINER, Mehtap Gül ALTAŞ, Güzin CAMKERTEN, Ahmet Özer ŞEHİRLİ, Nİlgün PAKSOY, Burcu Menekşe BALKAN, Gülten SENOCAK SORAN	278-283
Fungusit tebukonazolün tatlı su midyelerine (<i>Unio mancus</i>) toksik etkilerinin çoklu biyobelirteçlerle incelenmesi 👤 Miraç UÇKUN	284-297
Yumurtaya verilen monosodyum glutamat'ın tavuk embriyolarında medulla spinalisin servikal bölgesinin embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi 👤 Ferhan BÖLÜKBAŞ, Yasemin ÖZNURLU	298-311
Case Reports	
Diagnosis of Avian Tuberculosis in laying hens by pathological, microbiological and polymerase chain reaction (PCR): Case report 👤 Orhan YAVUZ, Özgür ÖZDEMİR, Zafer SAYIN, Fatih HATİPOĞLU, Hasan Hüseyin HADİMLİ	312-317
Review Article	
Astaksantin'in kimyası ve uygulamaları üzerine bir inceleme 👤 Çiğdem DİKEL	318-330
Prematüre buzağuların bakım ve tedavisine güncel yaklaşımlar 👤 Mahmut OK, Merve İDER, Muhammed Mustafa KAPAR, İbrahim Kubilay YILDIZ	331-342

Subakut malathion uygulamasının oksidatif stres biyobelirteçlerine etkisi

Effect of subacute malathion application on oxidative stress biomarkers

ÖZET

Bu çalışmada malathionun oksidatif stres biyobelirteçleri ve karaciğer enzimleri üzerine etkileri ile kafeik asit fenetil esterinin malathionla karşı koruyuculuğunun araştırılması amaçlandı. Çalışmada her grupta 10 adet hayvan olacak şekilde toplam 40 adet (200-240 g) erişkin erkek Sprague Dawley ırkı rat kullanıldı. Çalışmada kontrol (K) grubuna gavaj yoluyla 5 ml/kg mısır yağı, malathion (MAL) grubuna gavaj yoluyla 40 mg/kg malathion, malathion+kafeik asit fenetil ester (MAL+CAPE) grubuna intraperitoneal yolla CAPE (10 µmol/kg) ve 1 saat sonra gavaj yoluyla malathion (40 mg/kg), kafeik asit fenetil ester (CAPE) grubuna ise intraperitoneal yolla CAPE (10 µmol/kg) uygulandı. 15 günlük uygulama sonunda ratların ketamin/ksilazin anestezisi altında intrakardiyak olarak kanları alındı ve hayvanlara servikal dislokasyon yöntemi uygulandı. Alınan kan örneklerinden elde edilen plazmada paraoksonaz (PON), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) aktiviteleri ile yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri analiz edildi. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre MAL ve MAL+CAPE gruplarında plazma PON aktivitesi ve HDL düzeylerinde azalma ($P<0.01$) olduğu, AST-ALT aktivitelerinde ($P<0.05$) MDA ve NO düzeylerinde ise ($p<0.01$) artış olduğu tespit edildi. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, malathionun oksidatif stres biyobelirteçlerinde önemli değişiklikler meydana getirdiği, CAPE'nin ise bu değişiklikleri önleyebileceği ve malathion toksikasyonuna karşı koruyucu olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Kafeik asit fenetil ester, malathion, nitrik oksit, oksidatif stres, paraoksonaz,

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effects of malathion on oxidative stress biomarkers and liver enzymes and the protection of caffeic acid phenethyl ester against malathion. In the study, a total of 40 (200-240 g) adult male Sprague Dawley rats with 10 animals in each group were used. In the study, 5 ml / kg corn oil by gavage in the control (C) group, 40 mg / kg malathion by gavage in the malathion (MAL) group, CAPE (10 µmol / kg) intraperitoneally in the malathion + caffeic acid phenethyl ester (MAL + CAPE) group. After 1 hour, malathion (40 mg / kg) was administered by gavage, and CAPE (10 µmol / kg) was administered intraperitoneally to the caffeic acid phenethyl ester (CAPE) group. At the end of 15 days of application, the blood of the rats was intracardiac under ketamine / xylazine anesthesia and the animals were applied cervical dislocation method. Paraoxonase (PON), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) activities and high-density lipoprotein (HDL), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels were analyzed in plasma obtained from blood samples. When the analysis results were evaluated, plasma PON activity and HDL levels decreased ($P<0.01$) in MAL and MAL+CAPE groups compared to the control group, while AST-ALT activities ($P<0.05$), MDA and NO levels increased ($p<0.01$) was detected. According to the results obtained from the study, it was determined that malathion caused significant changes in oxidative stress biomarkers, while CAPE could prevent these changes and be protective against malathion toxicity.

Keywords: Caffeic acid phenethyl ester, malathion, nitric oxide, oxidative stress, paraoxonase,

How to cite this article

Deveci, HA., Nur, G., Aksu-Kılıç, P. (2021). Effect of subacute malathion application on oxidative stress biomarkers. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 193-201. <https://doi.org/10.31797/vetbio.917112>

Research Article

Hacı Ahmet Deveci^{1a}
Gökhan Nur^{2b}
Pınar Aksu-Kılıç^{3c}

¹Department of Biochemistry and Technology, Faculty of Science and Arts, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey

²Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Iskenderun Technical University, Hatay, Turkey

³Department of Biology, Faculty of Art and Science, Kafkas University, Kars, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-3862-1991](https://orcid.org/0000-0002-3862-1991)

^b[0000-0002-5861-8538](https://orcid.org/0000-0002-5861-8538)

^c[0000-0002-3567-5775](https://orcid.org/0000-0002-3567-5775)

Correspondence

Hacı Ahmet DEVECİ

h.ahmet_deveci@hotmail.com

Article info

Submission: 15-04-2021

Accepted: 10-09-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution

4.0 International License



GİRİŞ

Pestisitler, tarım alanında zararlılar ile mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Ayrıca tarımsal amaç dışında evlerde, bahçelerde, kırsal bölgelerde sivrisinek ve yabancı otlarla mücadelede de pestisitlerden yararlanılmaktadır. Ancak toprakta uzun süre bozunmadan kalan pestisitler su, toprak ve hava kirliliğine sebep olup ekolojik dengeyi bozmaktadırlar. En önemli zararlı etkileri ise, besin zinciri yoluyla vücuda girerek insan ve hayvanlarda akut zehirlenmelere sebep olmaları ve pestisit yıkım ürünlerinin zamanla doku ve organlarda birikimi sonucunda biyolojik sistemlerde hasarlara neden olmasıdır (Vural, 1996; Deveci vd., 2015; Nur vd., 2018).

Pestisitlerin önemli bir sınıfını oluşturan organofosfatlı pestisitlerin (OP) temel etki mekanizması, hedef dokulardaki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin inhibisyonuna neden olarak dokularda asetilkolin birikimine yol açmalarıdır. Dokularda biriken asetilkolin sinir fonksiyonlarındaki hasarla birlikte geri dönüşümsüz akut ya da kronik zehirlenmelere neden olur (Hazarika vd., 2003; Alp vd., 2011; Nili-Ahmadabadi vd., 2013; Bogen ve Singhal 2016; Deveci ve Kaparehlivan 2018).

Organofosfatlı pestisitler sınıfına dahil olan Malathion [O,O-dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate] ilk kez 1950'lerde ticarileştirilmiş, 1980'lerden beri de dünya genelinde en çok satan geniş spektrumlu bir pestisittir. Malathion (MAL) genelde insektisit ve akarisit olarak tarımda, veteriner hekimlikte, tıbbi ve genel sağlık uygulamalarında kullanılmaktadır (Hazarika vd., 2003). Deri, solunum ve gastrointestinal sistem yoluyla vücuda alınan MAL, karaciğer ve böbrekte yüksek yoğunlukta birikmektedir. İnsanlarda malathionun toksik belirtileri; solunum problemleri, mide bulantısı, baş ağrısı ve baş dönmesidir. Karaciğerde metabolize edilen

MAL, etkin metaboliti olan maloksan'a dönüşerek vücuttan çoğunlukla safra, dışkı ve idrar ile atılmaktadır (Kaya vd., 2002; Alp vd., 2011).

Yapılan birçok deneysel çalışmada, akut ve kronik pestisit maruziyeti sonucu ortaya çıkan toksik etkilerin (immünotoksisite, nörotoksisite, hepatotoksisite, genetik toksisite, embriyotoksisite) patogeneğinde oksidatif doku hasarının rol oynadığı bildirilmektedir (Stephen vd., 1997; Eaton vd., 2012; Alp vd., 2012; Nur vd., 2018; Deveci ve Kaparehlivan 2018; Doğan vd., 2021).

Reaktif oksijen türleri, hücrede normal metabolik süreçlerde ve fizyopatolojik durumlarda oluşabilmektedir. Ancak oluşan bu oksidan maddeler organizmanın antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Normal şartlarda organizmada, oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. Antioksidan ve oksidanlar arasında ki bu dengenin oksidanlar lehine bozulmasına oksidatif stres denir (Tabakoğlu & Durgut, 2013; Deveci & Kaparehlivan 2018). Oksidatif stres, hücresel ve moleküler doku hasarı oluşum mekanizmalarının bir parçasıdır. Organizma, oksidatif strese maruz kaldığında antioksidan enzimlerin sentezini etkileyerek cevap verebilmektedir. Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres sonucunda en fazla etkilenen sistemlerden biri de antioksidan savunma sistemidir. Antioksidanlar doğrudan ve dolaylı yollardan ilaçların, karsinojenlerin, ksenobiyotiklerin ve toksik radikal reaksiyonların olumsuz etkilerine karşı hücreleri korurlar. Antioksidan savunma sistemi, oksidatif strese karşı etkili olursa dokularda herhangi bir hasar meydana gelmezken, oksidatif strese karşı etkisiz kalırsa antioksidan enzimler inhibisyona, DNA, lipit, protein ve diğer moleküller ise oksidasyona uğrayacaktır. Bu şekildeki etkileşim sonucunda hücre ve dokularda reversibil ya da irreversibil hasar meydana gelmektedir (Byun 1994; Tabakoğlu ve Durgut,

2013; Deveci vd., 2015; Nur vd., 2018; Deveci & Kaparehlivan 2018).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), propolis maddesinin aktif bir bileşeni olup; antiinflamatuvar (Borelli vd., 2002), antimikrobiyal (Meyuhas vd., 2015), farmakolojik (Banskota vd., 2001), nöroprotektif ve antioksidan (Öktem vd., 2005; Deveci & Kaparehlivan 2018) etkilerinin olduğu bildirilmiştir. CAPE'nin lipit peroksidasyonunu baskılayarak antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (Castaldo & Capasso 2002; Öktem vd., 2005; Anwar vd., 2012; Deveci & Kaparehlivan 2018).

Pestisitlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri ve bu etkileri önleyebilecek antioksidan etkili maddelerin belirlenmesi sağlığımız açısından büyük taşımaktadır. Yapılan bu çalışmada tarım alanında sıkça kullanılan malathionun ratlarda meydana getirebileceği oksidatif hasara karşı CAPE'nin koruyucu etkisi ve bazı oksidatif stres biyobelirteçlerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan pestisit malathion Sigma-Aldrich (CAS No. 121-75-5) ve koruyucu olarak verilen CAPE Sigma-Aldrich'ten (CAS No: 104594-70-9) temin edilmiştir. Çalışma materyalini, Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 40 adet (200-240 g) erişkin erkek Spraque Dawley ırkı ratlar oluşturdu. Her grupta 10 adet hayvan olacak

şekilde rastgele gruplar oluşturulan hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa sahip ortamda tutuldu. 10 gün boyunca ortama adaptasyonu sağlanan tüm ratlara yem ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Malathion mısır yağında çözüldürüldüğünden dolayı kontrol (K) grubuna gavaj yoluyla 5 ml/kg mısır yağı, malathion (MAL) grubuna gavaj yoluyla 40 mg/kg malathion, kafeik asit fenetil ester (CAPE) grubuna intraperitoneal yolla 10 $\mu\text{mol/kg}$ CAPE, malathion+kafeik asit fenetil ester (MAL+CAPE) grubuna ise intraperitoneal yolla 10 $\mu\text{mol/kg}$ CAPE ve 1 saat sonra gavaj yoluyla 40 mg/kg malathion uygulandı. Tüm gruplara yapılan doz uygulamaları aşağıda Tablo 1.'de verilmiştir.

Tüm gruplarda uygulamalar 15 gün boyunca sürdürüldü. Hayvanlar ketamin/ksilazin anestezisi altında iken kanları intrakardiyak olarak alındı ve servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmek suretiyle plazmaları elde edildi ve analizler başlayıncaya kadar -20°C de muhafaza edildi. Plazma PON aktivitesi Eckerson vd., (1983) metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. MDA düzeyleri Yoshiko vd., (1979) ve NO düzeyleri Miranda vd., (2001)'nin bildirdikleri metotlara göre spektrofotometrede (PowerWave XS, BioTek USA) kolorimetrik olarak ölçüldü. Plazma HDL düzeyleri ve Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT) aktiviteleri ise otoanalizörde ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

Tablo 1. Deneysel protokole göre oluşturulan gruplara yapılan madde uygulamaları

K grup	MAL grup	MAL+ CAPE grup	CAPE grup
5 ml/kg Mısır yağı (Gavaj)	40 mg/kg Malathion (Gavaj)	10 $\mu\text{mol/kg}$ CAPE (Intraperitoneal) + 40 mg/kg Malathion (Gavaj)	10 $\mu\text{mol/kg}$ CAPE (Intraperitoneal)

Subacut malathion application

Çalışma verilerinin istatistiksel analizleri SPSS paket programında (IBM SPSS Statistic 22) gerçekleştirildi. Deney grubu ortalamaları arasında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve eğer deney grupları ortalamaları arasında farklılık varsa

BULGULAR

Yaptığımız çalışmada gruplardan elde edilen plazma PON, AST, ALT aktivitesi, HDL, MDA ve NO düzeylerine ait sonuçlar ve bu sonuçlara ait istatistiksel analizler Tablo 2.'de verilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre MAL ve MAL+CAPE gruplarında plazma PON aktivitesi ve HDL düzeylerinde azalma ($P<0.01$) olduğu,

gözlenen bu farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığının saptanılması için grup ortalamaları üzerinde "Anova-Duncan" testi uygulanmıştır ve $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

AST-ALT aktivitelerinde ($P<0,05$) MDA ve NO düzeylerinde ise ($p<0.01$) artış olduğu tespit edildi. Benzer şekilde MAL ve MAL+CAPE grupları karşılaştırıldığında ise, MAL grubuna göre MAL+CAPE grubunda plazma PON aktivitesi ve HDL düzeylerinde önemli artış ($P<0.01$) olduğu, AST-ALT aktivitelerinde ($P<0,05$) MDA ve NO düzeylerinde ise önemli ($p<0.01$) azalma olduğu tespit edildi.

Tablo 2. Gruplara ait PON, AST, ALT aktiviteleri, HDL, MDA ve NO düzeyleri ile bunlara ait istatistiksel analizleri

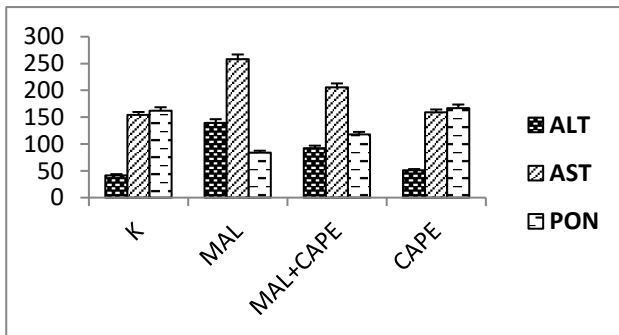
Parametreler	GRUPLAR (n:10)				p
	K (Mean±SD)	MAL (Mean±SD)	MAL+CAPE (Mean±SD)	CAPE (Mean±SD)	
PON (U/L)	162,02±7,07 ^a	84,11±5,54 ^c	117,83±7,13 ^b	166,88±8,9 ^a	*
AST (U/L)	154,25±16,14 ^c	257,85±32,35 ^a	205,71±24,63 ^b	158,75±18,51 ^c	**
ALT (U/L)	41,67±6,45 ^c	139,25±15,43 ^a	92,25±12,36 ^b	50,74±7,12 ^c	**
HDL (mg/dl)	61,45±2,86 ^a	47,20±3,10 ^c	52,56±2,90 ^b	62,66±2,77 ^a	*
MDA (µmol/L)	1,36±0,09 ^c	1,80±0,11 ^a	1,51±0,11 ^b	1,40±0,07 ^c	*
NO (µmol/L)	10,75±0,84 ^c	15,58±1,60 ^a	12,76±1,58 ^b	11,19±0,91 ^c	*

Ortalama±Standart sapma: $X\pm SS$.

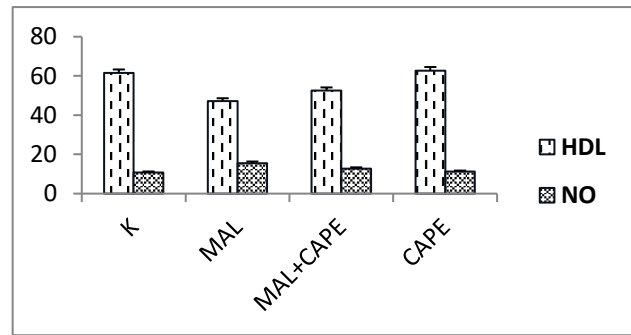
Average±Standart deviation: $X\pm SD$.

$X\pm SS$ ^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılık önemlidir ($*p<0.01$, $**p<0.05$).

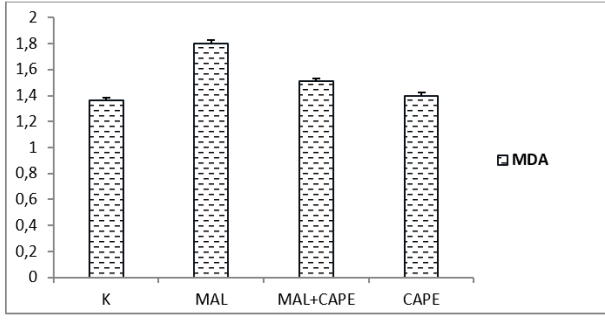
$X\pm SD$ ^{a,b,c}: The difference between the means with different letters in the same row is significant ($*p<0.01$, $**p<0.05$).



Şekil 1. Gruplara ait ALT, AST ve PON enzim aktiviteleri



Şekil 2. Gruplara ait HDL ve NO düzeyleri



Şekil 3. Gruplara ait MDA düzeyleri

TARTIŞMA

Dünya genelinde tarım sektöründe ürün kaybına sebep olan zararlılara karşı biyolojik ve kimyasal mücadele her geçen gün artmaktadır. Zararlılara karşı mücadelede kullanılan pestisitler içerisinde dünyada yaygın kullanılan ve en fazla zehirlenme olayına sebep olan grup organofosfatlı pestisitlerdir (John vd., 2001; Karami-Mohajeri & Abdollahi 2011) Organofosfatlı pestisitler içerisinde en yaygın kullanılanları ise chlorpyrifos, dichlofenthion, diazinon, parathion ve malathion'dur. Bu yüzden çalışmamızda toksik materyal olarak malathionu kullandık.

Malathion toksisitesinin en belirgin özelliği, geri dönüşümsüz AChE enzim inhibisyonuna sebep olmasıdır. Bunun yanı sıra malathionun oksidan moleküllerin artmasına, antioksidan moleküllerin ise azalmasına neden olduğu ve oksidatif stresi tetiklediği bildirilmiştir (Alp vd., 2012; İnce vd., 2017; Nur vd., 2018; Ullah vd., 2018). Oksidatif stres sırasında meydana gelen tipik reaksiyonlardan biri de doymamış yağ asitlerinde oluşan lipid peroksidasyonudur. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyon ürünlerinin en önemlisi olup organofosfatlı pestisit toksisitesinin ve lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Daha önce yapılmış olan birçok çalışmada organofosfatlı pestisitlerin MDA düzeylerini arttırdığı, koruyucu olarak verilen çeşitli antioksidan maddelerin ise MDA düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Akhgari vd., 2003; Mansour & Mossa 2009; Saxena vd., 2011; El-Demerdash 2011; Ural 2013; Çoban vd., 2015;

Uzun & Kalender 2013; Varol vd., 2015; İnce vd., 2017; Abdel-Salam vd., 2017; Abdel-Salam vd., 2018; Hosseini vd., 2019; Mohammadzadeh vd., 2020; Khalifa & Alkhalaf 2020; Nur vd., 2021). Bizim yaptığımız bu çalışmada ise diğer araştırmacıların çalışmalarına benzer olarak malathion uygulanan ratlarda MDA düzeylerinin arttığı tespit edildi. MAL+CAPE uygulanan gruplarda ise MDA düzeylerinin önemli oranda düştüğü belirlendi. MAL+CAPE grubu ratlarda MDA düzeyindeki azalmanın antioksidan etkiye sahip CAPE'nin lipid peroksidasyonunu engellediğinin bir göstergesi olabileceği kanaatindeyiz.

Nitrik oksit (NO) bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranarak hücreyi lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Bunun yanı sıra süperoksit ile reaksiyona girerek bir prooksidan olan peroksinitriti oluşturmaktadır (Praticò 2005). Yapılan bir çalışmada ratlarda malathion kaynaklı oluşturulan oksidatif hasarın, beyin dokusu üzerindeki etkisinin artan endojen NO biyosentezi ve indüklenbilir NO sentaz (iNOS) ekspresyonu aracılığıyla olduğu bildirilmiştir. Çalışmada oluşturulan beyin hasarı, seçici ve seçici olmayan NOS antagonistlerinin kullanılmasıyla en aza indirilmiştir (Abdel-Salam vd., 2017). Malathion ile yapılmış daha önceki çalışmalarda, malathionun uygulamasının NO düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (Elelaımy vd., 2012; Çoban vd., 2016; Abdel-Salam vd., 2017; Abdel-Salam vd., 2018). Yaptığımız çalışmada malathion uygulanan grupta NO düzeylerinin diğer gruplara göre önemli artış gösterdiği belirlendi. Ancak MAL+CAPE grubunda ise NO düzeylerinin sadece malathion uygulanan gruba göre düşük, kontrol ve CAPE grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol ve CAPE grubu arasında ise önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre, malathion toksikasyonu sırasında meydana gelen oksidatif strese bağlı olarak iNOS aktivitesinin artması ve bunun da NO düzeylerini arttırdığını kanaatindeyiz.

Canlılarda organofosfatlı pestisitlerin detoksifikasyonu; asetilkolinesteraz, karboksilesteraz ve paraoksonaz (PON) gibi enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Eyer vd., 2007; Peter vd., 2006; Deveci & Karapehliyan 2018). Organofosfatlı pestisitleri ve sinir gazlarını hidrolize edebilme özelliği nedeniyle PON, son yıllarda toksikolojik çalışmalarda önemli bir parametre olarak çalışılmaktadır. Kalsiyum bağımlı bir esteraz enzimi olan PON, karaciğerde sentezlenir ve serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)'e bağlı olarak taşınmaktadır. PON enziminin antioksidan özelliği HDL ve düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oksidasyondan korumasından kaynaklanmaktadır (Mackness vd., 1993; Aviram vd., 2003; Watson vd., 1995; Jaouad vd., 2003; Deveci vd., 2015). Daha önce yapılan çalışmalarda organofosfatlı pestisitlerin hem kan hem de doku paraoksonaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu, ayrıca HDL ve LDL düzeylerinde önemli değişiklikler meydana getirdiği gösterilmiştir (Abdel-Salam vd., 2017; Abdel-Salam vd., 2018; Varol vd., 2015; Deveci vd., 2017; Deveci & Karapehliyan 2018; Nur & Deveci 2018; Hosseini vd., 2019; Khalifa ve Alkhalaf 2020). Yaptığımız çalışmada malathion uyguladığımız ratlarda PON aktivitesi ve HDL düzeyinin diğer tüm gruplara göre önemli derece azaldığı, kontrol ve CAPE grupları arasında önemli olmadığı belirlendi. MAL+CAPE grubunda PON aktivitesi ve HDL düzeyini malathion verilen gruba göre yüksek, kontrol ve CAPE grubuna göre ise düşük olduğu belirlendi. Bu durum CAPE'nin pestisit maruziyetinde organizmanın antioksidan savunma sistemine katkı yaparak PON aktivitesi ve HDL düzeylerini yükseltebileceğini düşündürmektedir.

Karaciğer, organofosfatlı pestisitlerin ve diğer toksik maddelerin biyodönüşüme uğradığı major organdır. Malathionun en fazla zarar verdiği dokular karaciğer ve böbreklerdir. Çünkü karaciğerde metabolize edilen malathion, böbrek aracılığıyla vücuttan atılmaktadır. Artan serum

ALT ve AST aktivitelerinin karaciğer hasarının bir göstergesi olabileceği, ayrıca organofosfatlı insektisitlerin karaciğerde detoksifikasyonu esnasında bu enzimlerin aktivitesini yükseltebileceği bildirilmektedir (Khan vd., 2005; Kalender vd., 2010; Abdel-Salam vd., 2017; Hosseini vd., 2019; Khalifa & Alkhalaf 2020). Çalışmamızda elde edilen AST ve ALT sonuçlara baktığımızda, malathion uygulanan grupta AST-ALT aktivitelerinin tüm gruplara göre önemli derecede arttığı belirlendi. Ancak MAL+CAPE grubunda ise AST-ALT aktivitelerinin sadece malathion uygulanan gruba göre düşük, kontrol ve CAPE grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

SONUÇ

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile organofosfatlı bir pestisit olan malathionun oksidatif stresi arttırdığı ve organizma için toksik özelliğe sahip olduğu tespit edildi. Malathion uygulamasına karşılık antioksidan özelliği sabit olan CAPE'nin oksidatif stres biyobelirteç düzeylerinde önemli değişiklikler meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu durum tarım sektöründe çalışanların CAPE gibi antioksidan etkileri bilinen maddeleri önceden gıda takviyesi olarak almalarının önemli olduğunu ve organofosfatlı pestisit zehirlenmelerini önemli derecede önleyebileceğini düşündürmektedir.

AÇIKLAMALAR

Çalışmanın bazı parametreleri 1. Uluslararası 9.Ulusal Veteriner Biyokimya Kongresi (2018)'te poster bildiri olarak sunulmuştur.

Etik onay: Kafkas Üniversitesi, KAÜ-HADYEK
Tarih:22.11.2017, No: 2017-093

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır

KAYNAKLAR

- Abdel-Salam, O.M.E., Youness, E.R., Mohammed, N.A., Yassen, N.N., Khadrawy, Y.A., El-Toukhy, S.E., & Sleem, A.A. (2017). Nitric oxide synthase inhibitors protect against brain and liver damage caused by acute malathion intoxication. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 773-786.
- Abdel-Salam, O.M.E., Galal, A.F., Hassanane, M.M., Salem, L.M., Nada, S.A., & Morsy, F.A. (2018). Grape seed extract alone or combined with atropine in treatment of malathion induced neuro- and genotoxicity. *Journal of Nanoscience Nanotechnology*, 18, 564-575.
- Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., & Sebzevari, O. (2003). Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human and Experimental Toxicology*, 22, 205-211.
- Alp, H., Aytakin, I., Atakişi, O., & Ögün, M. (2011). The effects of caffeic acid phenethyl ester and ellagic acid on oxidative stress created by acute malathion toxicity in rat. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 117-124.
- Alp, H., Sak, M.E., Evsen, M.S., Fırat, U., Evliyaoğlu, O., Penbegül, N., Sancaktutar, A.A., Söylemez, H., & Tuzcu, M. (2012). Effects of malathion in fetal kidney tissues in pregnant rats: teratogenic effects induced by different doses. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 221-226.
- Anwar, J., Spanevello R.M., Thomé, G., Stefanello, N., Schmatz, R., Gutierrez, J., Vieira, J., Baldissarelli, J., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Rubin, M.A., Fiorenza, A., Morsch, V.M., & Schetinger, M.R.C. (2012). Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103, 386-394.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., & La Du, B.N. (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 892-904.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, 561-571.
- Bogen, K.T., & Singhal, A. (2017). Malathion dermal permeability in relation to dermal load: Assessment by physiologically based pharmacokinetic modeling of in vivo human data. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(2), 138-146.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., & Ialenti, A. (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73, 53-63.
- Byung, P.Y. (1994). Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-172.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 1-6.
- Çoban, F.K., İnce, S., Küçükkurt, İ., Demirel, H.H., & Hazman, Ö. (2015). Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 391-399.
- Çoban, F.K., Bulduk, İ., Liman, R., İnce, S., Cigerci, İ., & Hazman, Ö. (2016). Oleuropein alleviates malathion-induced oxidative stress and DNA damage in rats. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 98(1), 101-108.
- Deveci, H.A., Karapehlivan, M., Kaya, I., Kükürt, A., & Alpay, M. (2015). Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 62, 255-260.
- Deveci, H.A., Ünal, S., Karapehlivan, M., Ayata, M.K., Gaffaroğlu, M., Kaya, İ., & Yılmaz, M. (2017). Effects of glyphosate (herbicide) on serum paraoxonase activity, high density lipoprotein, total antioxidant and oxidant levels in Kars Creek Transcaucasian Barbs (*Capoeta capoeta* [Guldenstaedt, 1773]). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(5), 3514-3518.
- Deveci, H.A., & Karapehlivan, M. (2018). Chlorpyrifos-induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 36-41.
- Doğan, D., Deveci, H.A., Nur, G. (2021). Manifestation of oxidative stress and liver injury in Clothianidin exposed *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicology Research*, 10: 501-510,
- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Atrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P.S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 1-125.
- Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C.M., & La Du, B.N. (1983). The human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts. *American Journal of Human Genetics*, 35, 214-227.
- El-Demerdash FM. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1346-1352.
- Elalaimy, I.A., Ibrahim, H.M., Ghaffar, F.R.A., & Alawthan, Y.S. (2012). Evaluation of sub-chronic chlorpyrifos poisoning on immunological and biochemical changes in rats and protective effect of eugenol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 51-61.
- Eyer, P., Sznitz, L., Thiermann, H., Worek, F., & Zilker, T. (2007). Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. *Toxicology*, 233, 108-119.

- Hazarika, A., Sarka, S.N., Hajare, S., Kataria, M., & Malik, J.K. (2003).** Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185, 1-8.
- Hosseini, S.A., Saidijam, M., Karimi, J., Azari, R.Y., Hosseini, V., & Ranjbar, A. (2019).** Cerium oxide nanoparticle effects on paraoxonase-1 activity and oxidative toxic stress induced by malathion: a potential antioxidant compound, yes or no? *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 34, 336-341.
- İnce, S., Arslan-Acaröz, D., Demirel, H.H., Varol, N., Özyurek, H.A., Zemheri, F., & Küçükürt İ. (2017).** Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96: 263-268.
- Jaouad, L., Milochevitch, C., & Khalil, A. (2003).** PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radical Research*, 37, 77-83.
- John, S., Kale, M., Rathore, N., & Bhatnagar, D. (2001).** Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 12, 500-504.
- Kalender, S., Uzun, F.G., Durak, D., Demir, F., & Kalender, Y. (2010).** Malathion-induced hepatotoxicity in rats: the effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 633-638.
- Karami-Mohajeri, S., & Abdollahi, M. (2011).** Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Human & Experimental Toxicology*, 30(9), 1119-1140.
- Kaya, S., Pirinçci, İ., & Bilgili, A. (2002).** Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayinevi*, 414-415.
- Khalifa, K., & Alkhalaf, M.I. (2020).** Effects of black seed and thyme leaves dietary supplements against malathion insecticide-induced toxicity in experimental rat model. *Journal of King Saud University-Science*, 32, 914-919.
- Khan, S.M., Sobti, R.C., & Kataria, L., (2005).** Pesticide-induced alteration in mice hepatooxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta*, 358, 131-138.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C.A., & Durrington, P.N. (1993).** Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104, 129-35.
- Mansour, S.A., & Mossa, A.H. (2009).** Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 34-39.
- Meyuhas, S., Assali, M., Huleihil, M., & Huleihel, M. (2015).** Antimicrobial activities of caffeic acid phenethyl ester. *Journal of Molecular Biochemistry*, 4, 21-31.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., & Wink, D.A. (2001).** A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62- 71.
- Mohammadzadeh, L., Abnous, K., Razavi, B.M., & Hosseinzadeh, H. (2020).** Crocin-protected malathion-induced spatial memory deficits by inhibiting TAU protein hyperphosphorylation and antiapoptotic effects. *Nutritional Neuroscience*, 23, 221-236.
- Nili-Ahmadabadi, A., Pourkhalili, N., Fouladdel, S., Pakzad, M., Mostafalou, S., Hassani, S., Baeri, M., Azizi, E., Ostad, S.N., Hosseini, R., Sharifzadeh, M., & Abdollahi, M. (2013).** On the biochemical and molecular mechanisms by which malathion induces dysfunction in pancreatic islets in vivo and in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106, 51-60.
- Nur, G., & Deveci, H.A. (2018).** Histopathological and biochemical responses to the oxidative stress induced by glyphosate-based herbicides in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 10(1), 656-665.
- Nur, G., Husunet, M.T., Güler, I., Deveci, A., Koç, E., Nur, O., & Kilic, P.A. (2018).** The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on hepatic histopathology and oxidative stress in rats treated with malathion. *Medicine Science* 7(3), 604-609.
- Nur, G., Deveci, H.A., & Koç, E. (2021).** Preservation of Vitamin-E against Nephrotoxic Effect Induced by Subacute Dichlorvos Application. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(7), 8651-8659.
- Öktem, F., Özgüner, F., Sulak, O., Olgar, S., Aktürk, O., Yılmaz, H.R., & Altuntaş, I. (2005).** Lithium induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 77(1-2), 109-115.
- Peter, J.V., Moran, J.L., & Graham, P. (2006).** Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: An evaluation using meta-analytic techniques. *Critical Care Medicine*, 34, 502-510.
- Stephen, B., Kyle, L., Yong, X., Cynthia, A., Donald, E., Earl, F., & James, E. (1997).** Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 27, 196-208.
- Tabakoğlu, E., & Durgut, R. (2013).** Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri, *AVKAE Derg.* 3(1), 69-75.
- Ullah, S., Li, Z., Hasan, Z., Khan, S.U., & Fahad, S. (2018).** Malathion induced oxidative stress leads to histopathological and biochemical toxicity in the liver of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton) at acute concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 270-280.
- Ural, M.Ş. (2013).** Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio carpio*: Ameliorative effect of lycopene. *Chemosphere*. 90, 2059- 2064.
- Uzun, F.G., & Kalender, Y. (2013).** Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 549-556.

- Varol, S., Başarslan, S.K., Fırat, U., Alp, H., Uzar, E., Arıkanoğlu, A., Evliyaoglu, O., Acar, A., Yücel, Y., Kıbrıslı, E., & Gökalp, O. (2015).** Detection of borderline dosage of malathion intoxication in a rat's brain. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19, 2318–2323.
- Vural, N. (1996).** Toksikoloji. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 73, 342-373.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Rama, S.Y., La Du, B.N., Faul, K.F., Fogelman, A.M., & Navab, M. (1995).** Protective effect of high density lipoprotein associated Paraoxonase: Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 2882-2891.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., & Mori, M. (1979).** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 135, 372-376.

Endoparasite investigation in some fish species with high economic value obtained from Canakkale, Turkey

Research Article

ABSTRACT

The study is an endoparasitic examination of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1782), bogue (*Boops boops* Linnaeus 1758), horse mackerel (*Trachurus trachurus* Linnaeus 1758), sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792), and anchovy (*Engraulis encrasicolus* Linnaeus 1758) fish taken from Çanakkale fish state as an annual sampling between 01 September 2019- 01 September 2020. One thousand three hundred thirty-seven fishes were sampled. The external morphological examination of the fish brought to the laboratory was made, then the conditions of their visceral organs and their visceral structures were examined by dissection method. Nematodes collected alive from many parts of the body were kept in absolute (99.9%) ethanol. Parasites in ethanol were kept in glycerin for a few days before being examined under the microscope. Nematodes were first examined morphologically on a stereomicroscope and then under a light microscope for easy species identification. Classical detection methods have been used for species determination. As a result, among the individuals belonging to the Anisakidae family, *Anisakis* spp. L3 larval stage type 1 and type 2, *Anisakis physeteris* larval stage, *Contracaecum* larval stage, *Hysterothylacium aduncum* L3 larval stage were found. The density, abundance, and prevalence rates of the parasites in the infected fish are determined as a percentage.

Keywords: Anisakidae, bogue, chub mackerel, horse mackerel, nematoda

INTRODUCTION

Food safety can ensure that foodstuffs do not adversely affect consumer health by protecting them from chemical, biological, and physical hazards in the food chain (Official Gazette, 2008; Tayar, 2010; 2020). Increasing concerns about food safety with the changes in consumer habits cause both organizational and functional developments in the private sector and public sector. The state must adopt standards that provide a new perspective on food safety to ensure that the private sector gains an advantage in the competitive environment while preparing legislation and making controls on these issues. In addition, the existence of standards and structures to ensure food safety in every country raises compatibility problems with each other. It negatively affects the trade between countries producing similar products. For this reason, many companies and countries have come together and set standards for safe food supply and supply (FAO, 2011; Basaran, 2016). Since contamination can occur at every stage of the food production chain, public and regulatory authorities (European Commission, EFSA), International Organizations (FAO, WHO, OIE and CAC), producers and retailers of the food agriculture sector (BRC, IFS, GLOBALG.AP).

Ruhay Aldık^{1a}Fikret Cakır^{2b}Özlem Tonguç-Yayıntaş^{3c}Uğur Altınagac^{4d}

¹Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Canakkale Applied Sciences, Fisheries Technology, Canakkale, Turkey

^{2,4}Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Marine Sciences and Technology, Canakkale, Turkey

³Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Canakkale, Turkey

ORCID-

^a[0000-0001-5791-7491](https://orcid.org/0000-0001-5791-7491)

^b[0000-0001-5261-2365](https://orcid.org/0000-0001-5261-2365)

^c[0000-0002-3554-1881](https://orcid.org/0000-0002-3554-1881)

^d[0000-0002-3638-9834](https://orcid.org/0000-0002-3638-9834)

Correspondence

Özlem TONGUÇ YAYINTAŞ

ozlemyayintas@hotmail.com

Article info

Submission: 14-05-2021

Accepted: 10-09-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

How to cite this article

Aldık, R., Cakır, F., Tonguç-Yayıntaş, O., Altınagac, U. (2021). Endoparasite investigation in some fish species with high economic value obtained from Canakkale, Turkey. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 202-210. <https://doi.org/10.31797/vetbio.937180>

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



During the production process from the farm to the end consumer, they have adopted that food safety and quality can be achieved with an integrated and multidisciplinary approach, considering the entire food chain. The increase in clinical cases related to food safety has encouraged the private retail sector to develop management systems that ensure integrity, traceability, safety, and quality in food production. There is a constantly increasing customer demand for safe food supply from production to consumption in the aquaculture sector. For this reason, quality must be reliably maintained during the processing, storage, and marketing of seafood, which is a portion of sweet food. Producing healthy and high-quality fishery products depends on compliance with hygiene rules at every stage from production to consumption (Erkan et al., 2008). Some types of fish, affluent in fatty acids essential for human health, have found more places in our tables. Especially in the waters of Turkey, sea fish such as anchovy, sardines, horse mackerel, bogue, and chub mackerel have become indispensable for the fish market. Regardless of the type of fish in Turkey, almost all these mentioned fish species are encountered every season.

We can find these fish species on almost every table in our country and find their place on the tables by using different methods. To maintain a healthy life, attention should be paid to hygienic conditions in fish processing, and care should be taken not to consume undercooked or raw. Many disease factors can be passed on to humans due to undercooked and raw consumption or non-compliance with hygienic conditions (Zhang et al., 2018). One of these factors is endoparasites. Endoparasites are creatures that start their life cycle freely in water and can display a different life cycle in each host it enters. They continue their life cycle by entering the fish from places such as the mouth and porter. While some species use fish as their final hosts, others become their last

hosts by consumption of fish by mammals and birds. Endoparasites live in different parts of the body, from the blood to the organs in living things. They begin with oral ingestion and are mainly seen in the gastrointestinal region, including blood, brain, different parts of the cranium, and the heart. Unless severe symptoms are observed, humans can detect it too late or not (Chen et al., 2015; Casti et al., 2017).

Some of the endoparasites isolated from fish, such as chub mackerel, horse mackerel, anchovy, sardines, and bogue, are nematodes (Karl and Levsen, 2011; Ozer and Olguner, 2013). There are body structures between 50 mm -10 cm in length and 1-20 μ m in diameter. They are cream-white. Their bodies are covered with a flexible, soft, and thick cuticle layer. Knowing the esophageal structure and its distance to the ventricular structure and its location with the intestinal structure are essential in determining the species (Elibuyuk Sahin, 2006; Tepe and Oğuz, 2013; Cavallero et al., 2015; Roca et al., 2018). These differences in the ventricular structure-small intestine junction are important taxonomic features for identifying species in the Anisakidae family. The nervous system structure is in the form of a ring called a nerve ring or a nerve collar around the esophagus. The excretory system ends with the discharge opening. The structure of the excretory opening guides the separation of nematode species, with different shapes opening out from the base of the sub ventral lips or the nerve ring. Different types of L2 and L3 forms from only larval forms of nematodes are observed in fish. Nematode species that use fish or mollusks as final hosts do not pass on to humans or other mammals, being non-zoonotic. In fish and marine mammals that are the last host; with L3, L4, they turn into 5th stage larvae (L5) and then become mature (Pekmezci et al., 2014; Kroff et al., 2017; Ozturk, and Yesil, 2018). Humans are caught by consuming the carrier intermediate hosts, which contain L3 in their tissues, and the fish, which are the second

intermediate hosts containing L4, in raw or undercooked form.

In the Canakkale region, the most affordable and preferred fish types hunted and observed at the fish market stalls are chub mackerel, horse mackerel, bogue, anchovies, and sardines. The parasites found in these fish cause problems in the local economy and the fish's visual and meat quality. Consumption of fish with parasites is not preferred. Our study was carried out by purchasing these fish from the fish market with monthly samples all year round. It was aimed to determine the effects of endoparasites, especially nematodes, seasonal and monthly infection formation, fish height and weight, and the prevalence, density, and abundance of the parasites in fish by examining the fish purchased from the fish market.

MATERIAL and METHOD

Fishes were sampled monthly from the Çanakkale Fish Market for 12 months between September 2019 and 2020. In the research, a total of 1337 fish, including 89 chub mackerel, 171 bogue, 350 horse mackerel, 277 anchovy,

RESULTS

In the fish samples taken into the study, 98 nematode individuals were isolated from chub mackerel, 2 in bogue, 27 nematodes in horse mackerel, 10 nematode individuals in anchovy, and no endoparasites were found in sardines. It was observed that the isolated nematodes

and 450 sardines, were examined in terms of endoparasites. As a result of the observations made, generally, free-moving nematode parasite individuals were found buried on the internal organ surfaces of the fish. All parasites in each fish were carefully collected and taken into 99.9% absolute ethanol for microscopic examinations. Parasite individuals taken in ethanol were softened by taking them in glycerin during the examination and made suitable for photography by allowing the alcohol to evaporate. The parasites were first examined under a stereomicroscope, then taken between the coverslip and taken to a more detailed examination under the light microscope and photographed. Species of the parasites were determined by considering the anatomical and morphological features of the parasite, such as the size, general appearance, features of the head and tail structures, esophagus, and secum lengths. As the type designation key; Elibuyuk Sahin (2006) Setyobudi et al., (2011); Mehlhorn, (2012); Sahin, (2014); Pozio, (2015); Morsy et al., (2017); Simsek et al. (2018) benefited from the studies.

mostly wandered on the organs in the body cavity. However, some of the nematodes taken from the chub mackerel fish in January were on the liver (Figure 1).



Figure 1. a) Nematode with cyst (arrow) buried in chub mackerel's liver, b) Nematode in cyst.

In the March sampling of the horse mackerel, it was observed that they were embedded in the

cysts on the gonads of the female fish individual. It was determined that the

nematodes taken from fish whose parasitological examinations were completed, Anisakidae family members, *Anisakis typica* L3 Type 2 larva (Figure 2), *Contracaecum pelagicum* L3 larva (Figure 3), *Hysterothylacium* spp. L3 larvae non-mucous

stage (synonymous: *Contracaecum* spp.) L3 larva (Figure 4), *Anisakis physeteris* L3 larvae (Figure 5) *Anisakis* spp. L3 type 2, 3 (Figure 8), *Contracaecum* spp. L3 larva (Figure 7), *Hysterothylacium* spp., *Anisakis simplex* L3 larvae (Figure 6) larva has been identified.

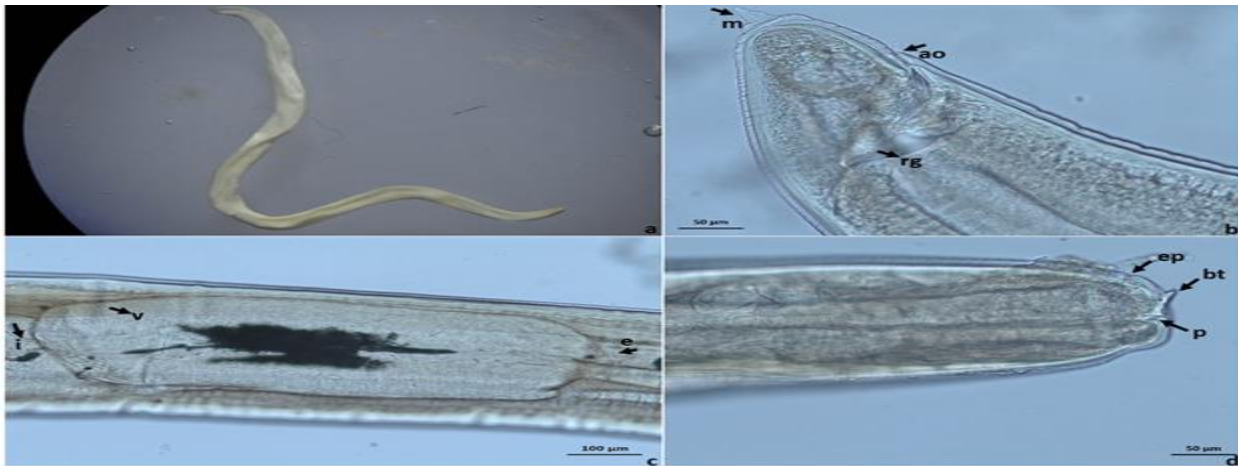


Figure 2. Sampling from chub mackerel (*Scomber japonicus*) *Anisakis typica*. L3 Type 2; a) External Morphology, b) Posterior Part (m: mucron, ao: anus opening, rg: rectal gland), c) Ventricular Part (v: ventriculus, e: esophagus, i: intestine), d) Anterior Part (bt: tooth, ep: papilla, p: papilla).

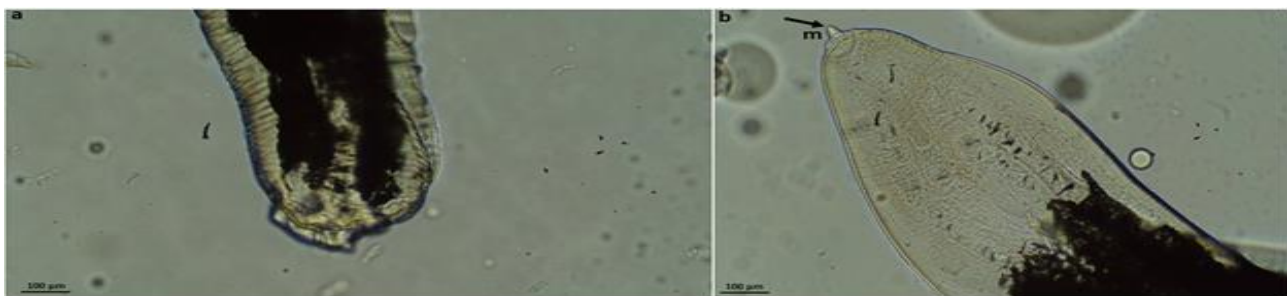


Figure 3. Sampling from chub mackerel (*Scomber japonicus*) Larva of *Contracaecum pelagicum* L3 a) Anterior part (cephalic end), b) Posterior part (m: mucron).

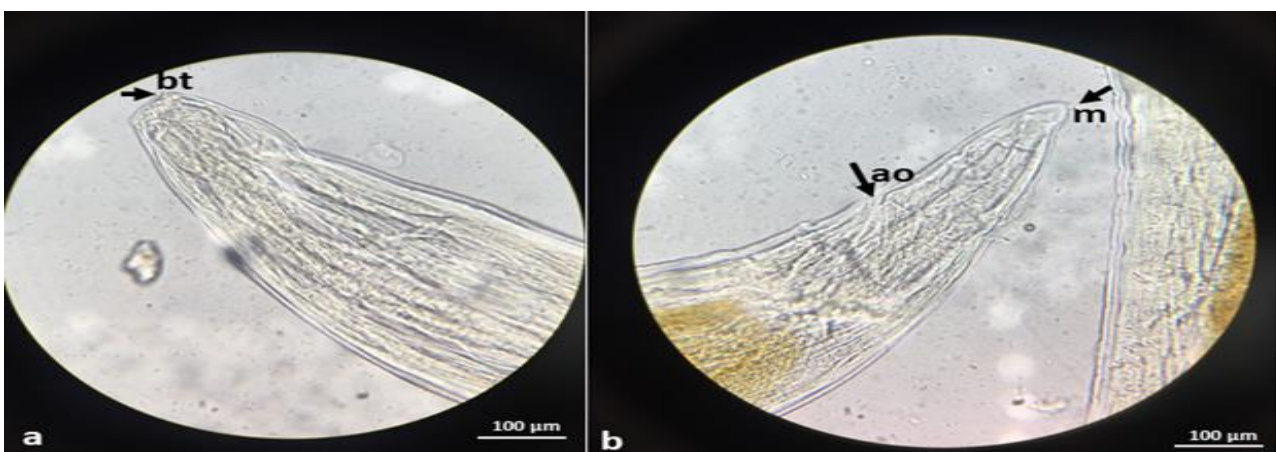


Figure 4. Sampling from horse mackerel (*Trachurus trachurus*) (*Contracaecum* spp., Synonymous) *Hysterothylacium* spp. L3 form larva a) anterior part cephalic Son (bt: tooth); b) posterior part (m: mucron, ao: anus opening).

While nematodes occur mainly in the autumn season, the fish taken in the summer and spring periods show high, respectively. Annual

nematode prevalence is 4.26%. Of the 137 nematodes, 98 (72%) were isolated from chub mackerel, 27 (20%) from horse mackerel, 10

Endoparasite investigation

(7.3%) from Anchovy, and 2 (1%) from bogue. There is no nematode isolated from sardines. Parasitic nematodes were primarily observed in March. The annual prevalence of the parasite is 43.82%, its density is 2.51, and its abundance is 1.10. The seasonal dominance percentage of nematodes, which are primarily observed in chub mackerel throughout the year.

The total number of nematodes observed in 7 of the horse mackerel is 27 (19.71%) and it is 2% prevalent in annual sampling. Its density is 3.86 and abundance is 0.08. The annual prevalence level of nematodes in bogue found to be 0.58%, the average density as 2, and the average abundance as 0.012. The annual prevalence level of nematodes in anchovy is 3.63%, density one, and abundance 0.04.

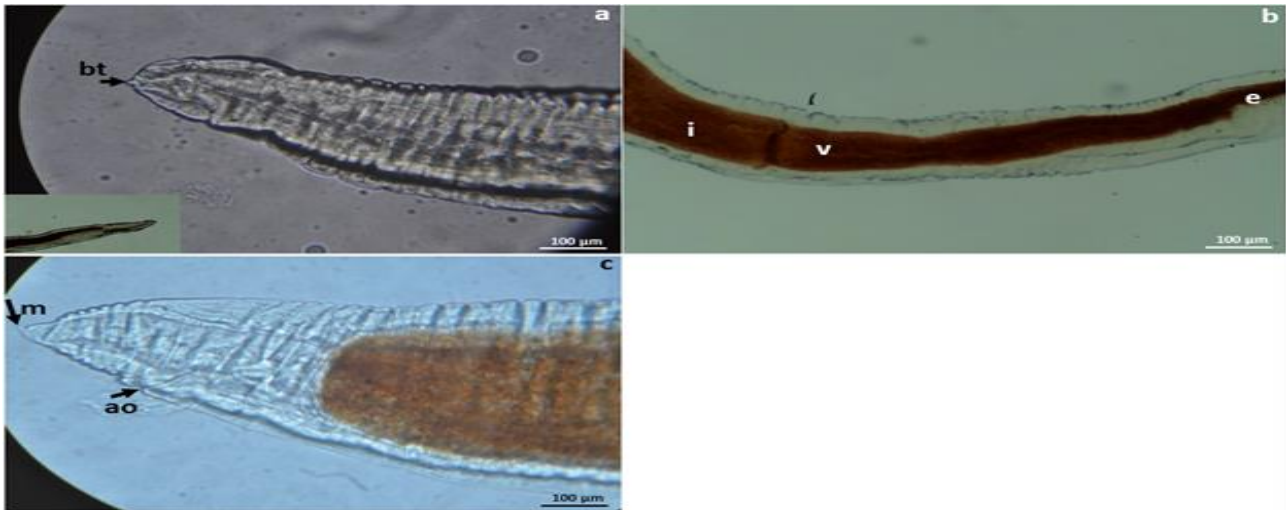


Figure 5. *Anisakis physeteris* L3 larval form in horse mackerel (*Trachurus trachurus*). a) Anterior Part (bt: tooth), b) Ventricular Part (i: intestine, v: ventriculus, e: esophagus), c) Posterior Part (m: mucron, ao: anus opening).

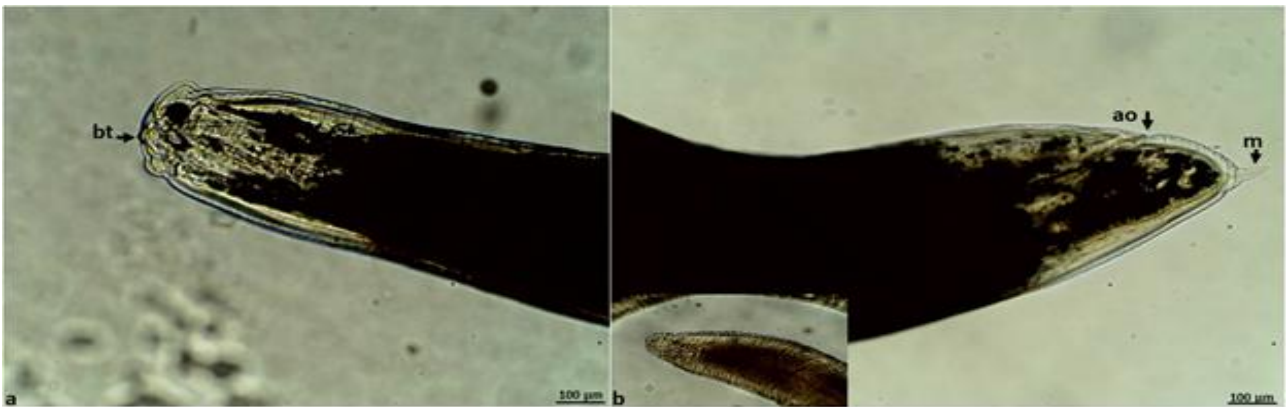


Figure 6. *Anisakis simplex* L3 larval form in anchovy (*Engraulis encrasicolus*). a) Anterior Part (bt: tooth), b) Posterior Part (ao: anus opening, m: mucron).

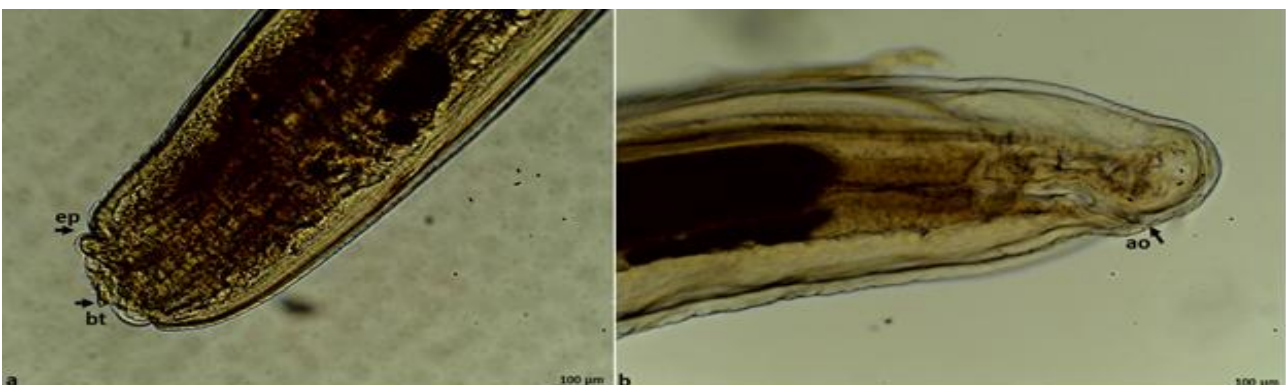


Figure 7. *Contracaecum* sp. in bogue (*Boops boops*). L3 Larva a) Anterior part (ep: excretory opening, bt: tooth), b) Posterior part, (without mucous, ao: anus opening).

In March, parasitism was observed in chub mackerel at a minimum height of 19.7 cm and a weight of 61.32 gr. Parasitism in horse mackerel was detected in March at a minimum length of 15.2 cm and a weight of 28.87 g. In May, when parasitism was observed, the

average height of bogue is a minimum of 26.16 cm, and weight is 177.3 gr. During the months (January and August), when nematodes were found in 10 of the 350 anchovies, the minimum fish length and weight are 14.90 cm, respectively: 14.01 cm and 19.74 g 16.50 gr.

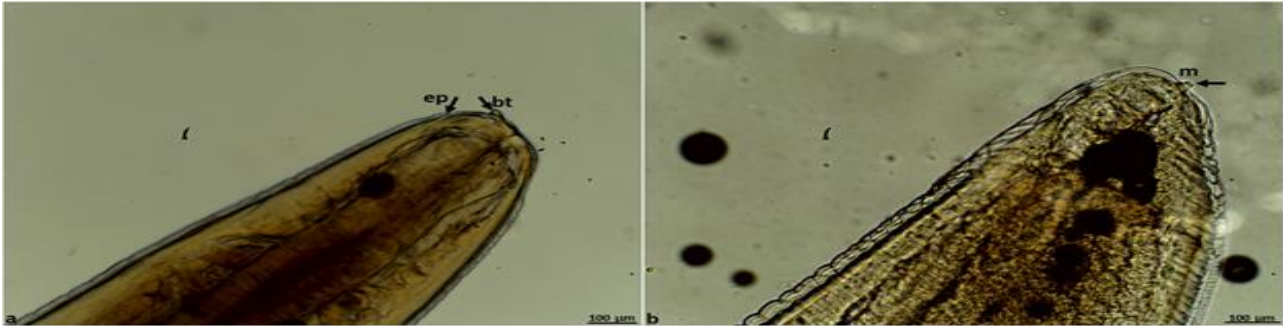


Figure 8. *Anisakis* spp. in bogue (*Boops boops*). L3 larva a) Anterior part (ep: discharge opening, bt: tooth), b) Posterior part (m: mucron).

As a result of the study, the variation in the prevalence, average density, and abundance of nematodes without differentiating fish species

DISCUSSION

In this study, horse mackerel, chub mackerel, bogue, sardines, and anchovies caught from the North Aegean Sea, Canakkale region, and frequently consumed by the local people, were examined for zoonotic fish parasites. As a result of the investigation, the locations of parasites, infected fish rates, number of parasites, abundance, density, prevalence values, and the prevalence (%) by height, weight, and species were calculated. As a result of the parasitological examination of the fish, *Anisakis typica* L3 Type 2 larva, *Contracaecum pelagicum* L3 larva, *Hysterothylacium* spp. (synonymous: *Contracaecum* spp.) L3 larva, *Anisakis physeteris* L3 larval have been identified. Molina et al. (2000) parasitologically analyzed fish consisting of 18 different species, including haddock, from fish markets in the Northern part of Cordoba State. Individuals belonging to the Anisakidae family identified in the body cavity and muscles of fish. The study reported that these parasites are at their peak

by months; the highest prevalence of 47 parasites (10.68%) was calculated in March, the lowest recorded as 1 (0.76%) in April.

seasonally, with 42% in haddock fish, in the spring months. In our study, the most intense

parasitization in collegial fish was observed in March with 72%. This showed us that the prevalence value and seasonal density in both studies coincided with the spring months. In addition, studies have shown that nematode species were higher in common chub mackerel and horse mackerel fish compared to other fishes studied between January and June, and the rate of parasitization with nematodes decreased in the period from July to December. No parasitism was observed in sardines throughout the year. Tuncel and Akmirza (2006) encountered *Contracaecum aduncum* and *Anisakis simplex* nematodes in their parasitological examination on anchovy fish caught from the coast of Sinop and the Marmara Sea. It stated that in 21% of the anchovies examined, *Contracaecum aduncum* found in 98.8%, and *Anisakis simplex* in 0.17%. Our study revealed that nematode individuals

isolated from anchovies from fish form belong to the L3 larval form of *Anisakis simplex* parasite. It was observed that the nematode density of anchovy fish was low in annual sampling. Nematodes belonging to *Anisakis* and *Contracaecum* species were determined by parasitological examinations of the horse mackerel in a study (Akmirza 2001) conducted in the Aegean Sea and South Marmara offshore. He reported that parasites are localized, especially in fish intestines, and their prevalence was 8.77% and 38%, respectively. They stated that in year-round sampling, the parasites reached their highest level in March and their lowest in September. Our study observed that the highest parasitization intensity was observed in horse mackerel and mackerel fish in March, while parasitism was observed only in chub mackerel fish in September.

Keser et al. (2007) conducted parasitological examinations in *Trachurus trachurus*, *Engraulis encrasicolus*, *Sardinella aurita*, *Liza saliens*, *Belone belone*, *Sparus aurata*, *Solae solea*, *Scomber scombrus* and *Pomatomus saltatrix* fish species in a study they conducted in the Dardanelles. As a result of the study, they detected *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex* nematodes. They did not find any nematode parasites in *Sardinella aurita*. In light of the findings of our study, parasitism was observed in different densities and abundances on an annual basis in horse mackerel fish, and no parasitism was found in sardine fish (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). Our study supports the results of Keser et al.

Hysterothylacium aduncum Rudolphi, 1802 species were identified in the parasitological examination of sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) fishes caught from the Eastern and Southern coasts of Spain. This parasite reported a 25.21% prevalence, a 2.10 density, and a 0.52 abundance level (Rello et al., 2008). No parasites were found during the annual

parasitological examination on sardines taken from the Canakkale fish state in our study.

In April, two nematodes (1.46%) were found in the bogue studied. The annual prevalence level is 0.58%, the average density is 2, and the average abundance is 0.012. *Hysterothylacium* sp. L3 larvae non-mucous stage and *Anisakis* spp. L3 Type 2 larvae have been identified. Of these species, only *Anisakis* can be found Atlantic (MacKenzie et al., 2008), Mediterranean (Mattiucci et al., 2008), Marmara and Black Sea (Tepe, 2011). In his study in 2019, Köksal isolated nematodes from thirty different fish species from the intestine, pyloric cecum, gall bladder, and body cavity. All nematodes we isolated in our study observed in similar organs, and two nematodes were detected in the sac in the liver of the fish.

Especially in Turkey, which has an important place in terms of aquaculture, laws and regulations and healthcare professionals responsible for the protection and control of fishery products should examine the issue of zoonoses because these creatures are also crucial in terms of public health. Humans are essential hosts, especially for their aquatic consumption habits and zoonotic creatures to continue their life cycle. To prevent Anisakidosis, which is frequently seen in the Far East and Asian countries, it is recommended to avoid the consumption of raw and undercooked seafood, especially fish, and to pay attention to food and hygiene conditions in places where fishery products sold.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Canakkale Onsekiz Mart Scientific Research Commission (BAP-2019-2904) for financial support.

Ethical approval: Date: 04.04.2019 - 2019/03

Number: HADYEK-2019-1900050960

Conflict of interest: The authors stated that there is no conflict of interest

REFERENCES

- Akmırza, A. (2001).** İstavrit balığında (*Trachurus trachurus* Linnaeus, 1778) rastlanan parazitlerdeki mevsimsel değişimler, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18, (1-2): 33-37.
- Başaran, B. (2016).** ISO 22000 gıda güvenliği yönetim sistemi, *Journal of Food and Health Science*, 2(1), 9-26.
- Casti, D., Scarano, C., Piras, M.C., Merella, P., Muglia, S., Piras, F., Garippa, G., Spanu, C., Luigi de Santis, E.P. (2017).** Occurrence of nematodes of the genus *Anisakis* in Mediterranean and Atlantic fish marketed in Sardinia. *Italian Journal of Food Safety*, volume 6:6185.
- Cavallero, S., Magnabosco, C., Civettini, M., Boffo, L., Mingarelli, G., Buratti, P., Giovanardi, O., Fortuna, C.M., Arcangeli, G. (2015).** Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology* 200, 18–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.017>.
- Chen, Y.-J., Wu, C.-C., Yang, J.-S. (2015).** Occurrence of *Anisakis* larvae in commercial fish along the northern coast of Taiwan. *Research Journal of Parasitology*, 10 (3), 79-91. ISSN 1816-4943 / DOI: 10.3923/jp.2015.79.91.
- Elilibüyük Şahin, G. (2006).** Ankara'da satılan hamsi, istavrit ve mezzit balıklarında Anisakidae enfeksiyonları. *Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı*, Doktora Tezi, 51s.
- Erkan, N., Alakavuk, Ü.D., Tosun, Ş.Y. (2008).** Gıda Sanayinde Kullanılan Kalite Güvence Sistemleri, *Journal of Fisheries Sciences*, 2(1), 88-99. DOI: 10.3153/jfscom.2008009.
- Washington, S., Ababouch, L. (2011).** Private standards and certification in fisheries and aquaculture: current practice and emerging issues. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, No. 553, 181p. ISBN 978-92-5-106730-7.
- Karl, H., Levsen, A.** Occurrence and distribution of anisakid nematodes in Grey gurnard (*Eutrigla gurnardus* L.) from the North Sea Food Control, 22, 1634-1638. doi:10.1016/j.foodcont.2011.03.021.
- Keser, R., Bray, R., Oğuz, M., Çelen, S., Erdoğan, S., Doğutürk, S., Akdoğan, G., Martı, B. (2007).** Helminth parasites of digestive tract of some teleost fish caught in the Dardanelles at Çanakkale, Turkey, *Helminthologia*, 44(4): 217 – 221.
- Knoff M., Gonçalves da Fonseca, M.C., Felizardo, N.N., Lúcia dos Santos, A., Carmona de São Clemente, S., Kohn, A., Gomes, D.C. (2017).** Anisakidae and Raphidascarididae nematodes parasites of tuna (Perciformes: Scombridae) from State of Rio De Janeiro, Brazil. *Neotropical Helminthology*, 11(1), 45-52.
- Köksal, P.S. (2019).** Karadeniz'in Sinop kıyılarından yakalanan bazı balık türlerindeki nematod parazit faunasının belirlenmesi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği ABD*, Yüksek Lisans Tezi, 92s.
- Mackenzie, K., Campbell, N., Mattiucci, S., Ramos, P., Pinto, A. L., Abaunza, P. (2008).** Parasites as biological tags for stock identification of atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fisheries Research*, 89, 136-145.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., Mackenzie, K., Ramos, P., Pinto, A. L., Abaunza, P., Mehlhorn, H. (2012).** Animal parasites diagnosis, treatment, prevention. 7th Edition. pp 356-378. ISBN 978-3-319-46402-2. ISBN 978-3-319-46403-9 (eBook). DOI 10.1007/978-3-319-46403-9.
- Molina, T. R., Aparicio, P. J., Bienes, H., M., Perez, J.R., Ruso, M. A., Franco, M. E. (2000).** Anisakidosis in flesh fish sold in the north of Cordoba. *Revista Española de Salud Pública*, 74(5-6), 517-26.
- Morsy K., Badr, A.M., Abdel-Ghaffar, F., El Deeb, S., Ebead, S. (2017).** Pathogenic potential of fresh, frozen, and thermally treated *Anisakis* spp. type II (L3) (Nematoda: Anisakidae) after Oral Inoculation into Wistar Rats: A Histopathological Study. *Journal of Nematology*, 49(4), 427–436.
- Nascetti, G. (2008).** *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from atlantic horse mackerel: their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research*, 89, 146-151.
- Ozer, A., Olguner, A.M. (2013).** Karadeniz'in Sinop kıyılarından yakalanan bazı deniz balıklarının metazoan parazitleri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 30(3), 93-97. DOI: 10.12714/egejfas.2013.30.3.01.
- Öztürk, T., Yeşil, A. (2018).** Metazoan parasite fauna of the red mullet, *Mullus barbatus* ponticus Essipov, 1927 in the Sinop coasts of the Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 153-160. DOI: 10.4194/1303-2712-v18_1_17.
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E., Bolukbas, C.S., Yardimci, B., Gurler, A.T., Acici, M., Umur, S. (2014).** Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Veterinary Parasitology*, 201, 82–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.005>.
- Piras M.C., Tedde, T., Garippa, G., Sanna, D., Farjallah, S., Merella, P. (2014).** Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern sardinia (western Mediterranean Sea). *Veterinary Parasitology*, 203, 237–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.003>.
- Pozio, E. (2015).** "Foodborne nematodes". Foodborne parasites in the food supply *Web*, 165–199. doi:10.1016/B978-1-78242-332-4.00008-4. ISBN 9781782423324.
- Rello, F., Adroher, F., Valero, A. (2008).** *H. aduncum* the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitology Research*, 104, 117-121.
- Resmi Gazete (2008).** Gıda güvenliği ve kalitesinin denetimi ve kontrolüne dair yönetmelik. *Resmî Gazete*, Sayı: 27009.

- Roca-Geronès X., Fisa R., Montoliu I., (2018).** 6. Biogeography of *Anisakis* (Anisakidae) and *Hysterothylacium* (Raphidascarididae) nematode species in consumed fish. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VIII*, 95-118. ISBN: 978-81-308-0579-5.
- Setyobudi, E., Jeon, C-H., Lee, C-H., Seong, K-B., Kim, J-H. (2011).** Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Parasitology Research*, 108, 585–592. DOI 10.1007/s00436-010-2101-x.
- Sahin A. (2014).** Çanakkale yöresinden avlanan kolyoz (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782), istavrit (*Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758)) ve sardalya (*Sardinella aurita* Valenciennes, 1847)'da nematodların araştırılması. Doktora tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s:100.
- Simsek E., Cıloğlu A., Yıldırım A., Pekmezci G.Z., (2018).** Identification and molecular characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in bogue (*Boops boops* L.) from the Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(4), 525-530. DOI: 10.9775/kvfd.2018.19482.
- Tayar, M. (2010).** Gıda güvenliği, Marmara Belediyeler Birliği, *Ekosan matbaacılık*, İstanbul
- Tayar, M. (2020).** Gıda güvenliği ve COVID-19. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 11(2), 61–71. <https://doi.org/10.38137/vetfarmatoksbulen.765700>.
- Tepe, Y. (2011).** Trabzon, Rize ve Artvin kıyılarından yakalanan bazı ekonomik öneme sahip teleost balıklarının endohelminth faunası. Doktora Tezi. *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Tepe, Y., Oğuz, M.C. (2013).** Nematode and acanthocephalan parasites of marine fish of the eastern Black Sea coasts of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 37, 753-760. doi:10.3906/zoo-1206-18.
- Zhang, K., Xu Z., Chen, H-X., Guo, N., Li, L. (2018).** Anisakid and Raphidascaridid nematodes (Ascaridoidea) infection in the important marine food-fish *Lophius litulon* (Jordan) (Lophiiformes: Lophiidae). *International Journal of Food Microbiology* 284, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.002>.

Evaluation of the effect of birth type on the blood gas and Apgar scores of Aleppo goat newborn kids

Research Article

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of eutocia and dystocia on the blood gas and Apgar scores of Aleppo goat kids. A total of 40 kids were examined, separated into 2 groups according to the type of birth. Group 1 (n=20) consisted of kids born as a result of eutocia, and the Group 2 (n=20) included kids born as a result of dystocia. The Apgar scores (appearance, pulse, grimace, attitude, respiration) were evaluated at 0, 5, and 15 minutes postpartum in the kids in both study groups, and blood samples were taken from blood gas injectors and blood gas profiles (pH, pCO₂, pO₂, HCO₃) were obtained. The data obtained were analyzed with the Mann-Whitney U-test and Friedman post-hoc Bonferroni tests. Spearman correlation coefficients were calculated to determine the relationships between measurements. A statistically significant difference was observed between the groups in the 0, 5, and 15-min Apgar scores and in the blood gas measurements of pH, pO₂, pCO₂, and HCO₃ at 0, 5, and 15 minutes (p<0.05). A significant time-dependent difference in Apgar score value was noted in both groups (p<0.05). There was a significant time-dependent difference in pH, pCO₂, pO₂, and HCO₃ values in both groups (p<0.05). In Group 1, a significant correlation was determined between Apgar and pCO₂ and HCO₃ values (p<0.05). In Group 2, a significant correlation was recorded between Apgar and HCO₃ values (r=-0.464; p<0.05). As a result, a significant difference was observed between the mode of delivery and the blood gases evaluated and Apgar scores. It was concluded that the evaluation of Apgar score and blood gases together would be more successful in neonatal interventions.

Keywords: Kid, dystocia, blood gases, Apgar

INTRODUCTION

The neonatal period is a critical period for the adaptation of newborn lives to the extrauterine environment (Piccione et al., 2007). This period is significantly affected by the pregnancy process, the mode of delivery and the quality of postpartum care (Türkoğlu et al., 2014). The adaptation processes of thermoregulation, cardiovascular, respiratory, metabolic and homeostatic mechanisms are completed during this period (Dwyer, 2008). Newborn lives are sensitive to adverse environmental conditions and perinatal diseases, and their metabolic status is highly variable (Piccione et al, 2007). During this period, numerous changes occur in different systems and organs, including respiratory function and acid-base balance (Camargo et al, 2012). Newborns may die due to trauma and prolonged hypoxia during delivery (Feitosa et al, 2012). Intrapartum hypoxia is of great importance in terms of newborn losses due to dystocia (Scott, 2006).

Tuğra Akkuş^{1a}
Ömer Korkmaz^{1b}
Birten Emre^{1c}
Abuzer K. Zonturlu^{1d}
Pelin F. Polat-Dinçer^{2e}
Ömer Yaprakçı^{1f}

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Şanlıurfa

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir

ORCID-

^a[0000-0002-6002-5942](https://orcid.org/0000-0002-6002-5942)

^b[0000-0001-5179-2181](https://orcid.org/0000-0001-5179-2181)

^c[0000-0001-8785-417X](https://orcid.org/0000-0001-8785-417X)

^d[0000-0002-9537-5117](https://orcid.org/0000-0002-9537-5117)

^e[0000-0003-4885-6513](https://orcid.org/0000-0003-4885-6513)

^f[0000-0002-7784-9438](https://orcid.org/0000-0002-7784-9438)

Correspondence

Tuğra AKKUŞ
tugraakkus08@hotmail.com

Article info

Submission: 16-06-2021

Accepted: 23-09-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

How to cite this article

Akkuş, T., Korkmaz, Ö., Emre, B., Zonturlu, A.K., Polat-Dinçer, P.F., Yaprakçı Ö. (2021). Evaluation of the effect of birth type on the blood gas and Apgar scores of Aleppo goat newborn kids. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 211-219. <https://doi.org/10.31797/vetbio.953136>

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



The Apgar scoring system was developed in human medicine to guide the clinical care of neonatal life immediately after birth. The Apgar scoring system was designed by Virginia Apgar, a human obstetric anesthesiologist, to monitor the effects of maternal anesthesiology on the newborn infant (Apgar, 1953). This method is widely and effectively used worldwide in the evaluation of newborns (Kredatusova et al., 2011). Adaptation of the original method to veterinary medicine was developed with great success (Vassalo et al., 2014). The Apgar score of lambs, modified by Born (1981), showed clinical signs of neonatal health and vitality conditions in a minimally invasive manner without impairing the mother-offspring relationship. The Apgar score was evaluated in 5 categories: Appearance, pulse, grimace, attitude, and respiration. Each parameter is scored with 0, 1, or 2 points, and the total of these is evaluated as 7-10 points indicating a healthy newborn, 4-6 points as moderate, and 0-3 points as severe depression (Apgar, 1953; Nelson ve Ellenberg, 1981). Total Apgar scores, which are used as a basis for resuscitation intervention, have been found to increase survival rates, and lower Apgar scores have been associated with higher mortality in the offspring (Vassalo et al., 2015; Veronesi et al., 2009). Although Apgar scoring has been used for approximately 50 years, it is a subjective method for reasons such as prematurity, congenital anomalies, gestational age, medication or anesthesia type applied to the mother, and the person who made the scoring (Gilstrap et al., 1989). Therefore, umbilical cord blood gas values have been accepted as a more reliable method of showing fetal oxygenation and acid-base status (Thorpe et al., 1989).

The aim of this study was to reveal the effect of birth type on venous blood gases and Apgar scores in Aleppo goat kids. Furthermore, as there is no information in literature about blood gases and Apgar score evaluations related to the

mode of birth in kids, it was thought that this study could contribute to the literature in this context. Thus, it is aimed to obtain healthier kids with and less loss of newborns.

MATERIAL and METHOD

Animal selection and experimental protocol

The study material consisted of 40 kids that were born on a private farm in the Eyyübiye District of Şanlıurfa. The offspring were selected by a random sampling method of Aleppo goats aged 3-5 years, who had one birth and were under the same feeding and management conditions. The goats used in the study had eutocia in the anamnesis taken, no postpartum problems, and only singleton animals were included in the study in order to objectively evaluate the parameters considered. The study was conducted between September and April. The kids were separated into 2 groups according to the birth types. Group 1 (n=20) consisted of kids born through eutocia (normal birth, natural birth without any complications), and Group 2 (n=20) included kids born through dystocia (difficult birth, difficulty or abnormal course of delivery). Dystocia was defined as the total time to delivery exceeding 90 minutes or when the fetal membranes ruptured and there was no progression for 30 minutes.

Blood gas and Apgar score evaluation

Venous blood gas levels (pH, pCO₂, pO₂, HCO₃) were determined from blood samples withdrawn into blood gas injectors from the kids in both study groups at 0, 5, and 15 minutes postpartum. The venous blood gas (pH, pCO₂, pO₂, HCO₃) measurements were performed using an Epoc[®] Blood Analysis System device. Apgar score evaluations were made with reference to the Apgar score assessments by Flora et al. (2020). Appearance was numerically determined as cyanotic, pale, or pink. Pulse and respiration were measured

indirectly through the ear set with a pulse oximeter (Vzn medical finger-type oxygen measuring device). Grimace was evaluated by gently tickling the nasal mucosal surface of the kids. Attitude was determined according to the reaction of the kids with stimulation to the pelvis region.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed with the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS for Windows; version 25.0) software. In calculating the sample size of the study, Power was determined by taking at least 80% and Type-1 error of 5% for each variable. The conformity of the variables to normal distribution was examined using visual (histogram and probability graphs) and analytical methods (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk tests). As the measurements did not show normal distribution, non-parametric tests were applied. Descriptive statistics for continuous variables in the study were expressed as mean, standard deviation, minimum, and maximum values. The Mann-Whitney-U test was applied to compare the measurements according to the type of delivery. The Friedman test was applied to compare the measurements according to time, separately in the groups. The post-hoc Bonferroni multiple comparison test was applied to determine the difference over time following the Friedman test. Spearman correlation coefficients were calculated to determine the relationships between measurements. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The mean values of the study groups are presented in Table 1 and Figure 1. A statistically significant difference was observed between the groups in the Apgar score at 0, 5, and 15 minutes and in the blood gas measurements of pH, pO_2 , pCO_2 , and HCO_3 at 0, 5, and 15 minutes ($p < 0.05$). In the evaluation

of the Apgar score at 0, 5 and 15 minutes between the groups, and the pH, pO_2 and HCO_3 blood gas measurements at 0, 5, and 15 minutes, the values of the eutocia group were found to be higher than those of the dystocia group ($p < 0.05$), and the pCO_2 measurement was higher in the dystocia group than in the eutocia group ($p < 0.05$). A statistically significant difference was observed in Apgar score value according to time in both groups ($p < 0.05$). In Group 1, the Apgar score at 0 minutes was lower than at the other times ($p < 0.05$). The 5 and 15-min Apgar scores were similar ($p > 0.05$). A statistically significant difference was observed in the time-dependent Apgar score evaluations in Group 2 ($p < 0.05$). All Apgar scores were found to be different from each other, as the Apgar score increased as time progressed. A statistically significant difference was observed in both groups in terms of pH value according to time ($p < 0.05$). In Group 1 and Group 2, pH values were different from each other at all measurement times ($p < 0.05$). The pH value increased in both groups as time progressed. A statistically significant time-dependent difference was observed in terms of pCO_2 value in both groups ($p < 0.05$). In Group 1 and Group 2, pCO_2 values were different from each other at all measurement times ($p < 0.05$). In both groups, the pCO_2 value decreased as time progressed. A statistically significant time-dependent difference was observed in terms of pO_2 value in both groups ($p < 0.05$). In Group 1 and Group 2, pO_2 values were different from each other at all measurement times ($p < 0.05$). In Group 1, the pO_2 value decreased as time progressed. In Group 2, the pO_2 value first increased and then decreased as time progressed. There was a statistically significant time-dependent difference in HCO_3 value in both groups ($p < 0.05$). HCO_3 values were found to be different from each other in all measurement times in Group 1 and Group 2 ($p < 0.05$). In Group 1, the HCO_3 value decreased as time progressed. In Group 2, the

HCO₃ value first increased and then decreased as time progressed.

The results of the correlation analyses between the Apgar scores and blood gas values measured in Group 1 are given in Table 2. A statistically significant correlation was found between Apgar-0 and pCO₂-5 values (p<0.05). This relationship was 45.8% negative, and it was determined that the Apgar-0 score decreased as pCO₂-5 increased. A statistically significant correlation was found between Apgar-5 and pCO₂-5 values (p<0.05). It was observed that this relationship was 47.6% negative, and as pCO₂-5 increased, the Apgar-5 score decreased. A statistically significant

correlation was found between Apgar-0 and HCO₃-15 values (p<0.05). It was observed that this relationship was 46.0% positive, and as HCO₃-15 increased, the Apgar-0 score also increased. A statistically significant correlation was found between Apgar-5 and HCO₃-15 values (p<0.05). This relationship was 55.6% positive, and as HCO₃-15 increased, the Apgar-5 score increased. The results of the correlation analyses between the Apgar scores and blood gas values measured in Group 2 are given in Table 3. A statistically significant correlation was found only between Apgar-0 and HCO₃-5 values (p<0.05). This relationship was negative at 46.4%, and as HCO₃-5 increased, the Apgar-0 score decreased.

Table 1. Average values of the study groups

	Group 1				Group 2				*p.
	Mean	SEM	Min.	Max.	Mean	SEM	Min.	Max.	
Apgar-0	7,45 ^b	1,64	5,00	10,00	6,10 ^c	1,89	4,00	10,00	0,021
Apgar-5	8,45 ^a	1,50	5,00	10,00	7,05 ^b	1,70	5,00	10,00	0,009
Apgar-15	8,95 ^a	1,10	7,00	10,00	7,60 ^a	1,60	5,00	10,00	0,004
**p	0,001				0,001				
pH-0	7,32 ^c	0,01	7,30	7,34	7,30 ^c	0,01	7,28	7,31	0,001
pH-5	7,35 ^b	0,01	7,34	7,36	7,32 ^b	0,01	7,31	7,33	0,001
pH-15	7,39 ^a	0,01	7,38	7,40	7,36 ^a	0,01	7,35	7,37	0,001
**p	0,001				0,001				
pCO₂-0	56,73 ^a	0,13	56,51	56,91	59,39 ^a	0,33	59,01	59,96	0,001
pCO₂-5	52,57 ^b	0,28	52,12	52,98	56,40 ^b	0,29	56,02	56,98	0,001
pCO₂-15	47,46 ^c	0,30	47,02	47,98	51,48 ^c	0,25	51,03	51,97	0,001
**p	0,001				0,001				
pO₂-0	22,39 ^a	0,33	22,01	22,92	17,33 ^b	0,26	17,01	17,91	0,001
pO₂-5	20,46 ^b	0,26	20,07	20,97	18,39 ^a	0,19	18,05	18,69	0,001
pO₂-15	17,45 ^c	0,23	17,02	17,89	14,50 ^c	0,27	14,02	14,89	0,001
**p	0,001				0,001				
HCO₃-0	31,43 ^a	0,29	31,02	31,92	28,41 ^b	0,25	28,09	28,81	0,001
HCO₃-5	30,64 ^b	0,26	30,12	30,98	29,56 ^a	0,23	29,12	29,97	0,001
HCO₃-15	28,46 ^c	0,28	28,01	28,94	27,59 ^c	0,29	27,04	27,97	0,001
**p	0,001				0,001				

* Significance levels according to Mann-Whitney-U test results→

** Significance levels according to Friedman test results↓

a,b,c: Shows time-to-time differences according to Bonferroni Post Hoc multiple comparison test↓

Table 2. Correlation analyses between the Apgar score and blood gases measured in Group 1

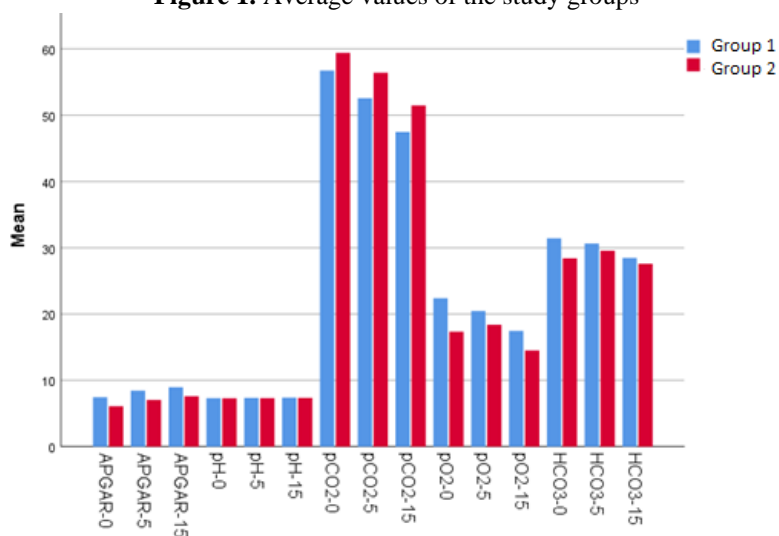
		Apgar-0	Apgar-5	Apgar-15
pH-0	r	0,050	0,089	0,155
pH-5	r	0,227	0,038	0,174
pH-15	r	0,386	0,334	0,360
pCO ₂ -0	r	0,077	0,227	0,142
pCO ₂ -5	r	-0,458*	-0,476*	-0,371
pCO ₂ -15	r	0,329	0,290	0,125
pO ₂ -0	r	-0,152	-0,034	0,346
pO ₂ -5	r	0,267	0,368	0,300
pO ₂ -15	r	0,188	0,198	0,366
HCO ₃ -0	r	0,129	0,041	0,066
HCO ₃ -5	r	0,080	0,216	-0,002
HCO ₃ -15	r	0,460*	0,556*	0,431

*p<0.05; **p<0.01 r: Spearman correlation coefficients

Table 3. Correlation analyses between Apgar score and blood gases measured in Group 2

		Apgar-0	Apgar-5	Apgar-15
pH-0	r	-0,344	-0,140	-0,093
pH-5	r	0,090	0,177	0,263
pH-15	r	0,283	0,111	0,313
pCO ₂ -0	r	0,099	-0,113	-0,089
pCO ₂ -5	r	-0,065	0,063	0,036
pCO ₂ -15	r	-0,169	-0,106	-0,107
pO ₂ -0	r	-0,076	0,020	0,057
pO ₂ -5	r	0,144	0,037	-0,052
pO ₂ -15	r	0,103	0,364	0,388
HCO ₃ -0	r	-0,031	0,096	0,195
HCO ₃ -5	r	-0,464*	-0,422	-0,409
HCO ₃ -15	r	-0,029	-0,055	-0,095

*p<0.05; **p<0.01 r: Spearman correlation coefficients

Figure 1. Average values of the study groups

DISCUSSION

The Apgar scoring system, which is applied as an evaluation criterion for the reduction of newborn losses, has been adapted and studied on pigs (De Roth ve Downie, 1976; Randall, 1971), horses (Vaala et al., 2002), calves (Vaala et al., 2002), dogs (Veronesi et al., 2009), donkeys (Bonelli et al., 2020), and sheep (Dutra ve Banchemo, 2011), but to the best of our knowledge, no studies have been conducted on kids. In the previous animal studies, only Apgar score evaluation was made, and evaluation was not performed together with fetal blood gas values. The aim of the present study was to reveal the effect of delivery method on venous blood gases and Apgar scores. It was also aimed to evaluate the parameters subjectively evaluated with the Apgar score and venous blood gases and to determine whether there is any relationship between these.

In Apgar scoring, respiration has been measured by counting breaths/minutes for horses (Vaala et al., 2002) and donkeys (Bonelli et al., 2020). In dogs, two parameters have been defined: newborn cries (no cry, subtle cry, cry) and respiratory rate (<6 to >15 breaths/minutes) after birth (Veronesi et al., 2009). The Apgar scoring system for lambs is qualitatively evaluated as good, regular (score = 2), slow, irregular (score = 1), and absent (score = 0) respiration, since newborn lambs do not sound like human infants, and breath/min monitoring using a stethoscope or monitoring the chest rise and fall has the potential for interobserver error (Dutra ve Banchemo, 2011). In a recent study, respiration was determined quantitatively using oxygen saturation (SpO₂) as detected by pulse oximetry (Flora et al., 2020). Apgar scoring was 67% ± 15% in normal lambs, based on previous studies showing 48 ± 6% SpO₂ in abnormal lambs (Norton et al., 1998). Respiration for Apgar scoring in the current study was evaluated using

pulse oximetry, similar to Flora et al. (2020), as <45% (score = 0), 45-65% (score = 1), and >65% (score = 2). The pulse oximeter is a small, inexpensive instrument that is easy to use in field conditions. The respiratory evaluations at 0 and 5 minutes in Apgar scoring in Group 1 in this study were seen to be in agreement with the findings of Flora et al. (2020). In addition, respiration was found to be lower in Group 2 in Apgar scoring at 0, 5, and 15 minutes. This was thought to be related to dystocia caused by the hypoxia that developed as a result of the long-term stay of the kids in the birth canal. It has been reported that the mucous appearance for Apgar scoring is associated with cardiovascular and respiratory distress in newborn foals, puppies, and lambs and is a strong indicator of the need for urgent intervention (Flora et al., 2020; Vaala et al., 2002; Veronesi et al., 2009). In the present study, the appearance for the Apgar scoring was classified according to appearance color as cyanotic (score = 0), pale (score = 1), and pink (score = 2). The evaluations at 0 and 5 minutes of Apgar scoring in Group 1 were found to be in agreement with those of Flora et al (2020). The appearance in Apgar scoring at 0, 5, and 15 minutes was lower in Group 2, which was attributed to problems in the respiratory or cardiovascular system as a result of dystocia. It has been reported that lambs born with weakness or that respond poorly to stimuli may miss forming a strong sheep-lamb bond in the first hour of life, increasing neonatal mortality (Dwyer et al., 2016). In the present study, grimace for Apgar scoring was evaluated with a method similar to that used for foals, donkeys and sheep (Bonelli et al., 2020; Dutra ve Banchemo, 2011; Vaala et al., 2002) by measuring the response to nasal stimulation with signs such as sneezing, coughing, moving the ears, or shaking the head. In the present study, grimace evaluations at 0 and 5 minutes in Apgar scoring in Group 1 were consistent with those of Flora et al. (2020). The grimace evaluation was found to be lower in

Group 2 in Apgar scoring at 0, 5, and 15 minutes, which was thought to be due to the fact that the kids born as a result of dystocia could not clean the respiratory tract by themselves as a result of the disruption in the respiratory system. Attitude for the Apgar scoring was modified based on lambs' responses to maternal attention (specifically, rump stimulation). In previous studies, attitude has been measured by the ability to maintain sternal reclining in foals (Vaala et al., 2002) and donkeys (Bonelli et al., 2020), and by the strength of spontaneous movement in bitches (Veronesi et al., 2009). The attitude assessment used in the present study was similar to the methods used in other species, with no response to stimuli (score=0), moving without trying to stand up (score=1), and trying to stand (score=2). In the attitude in Apgar scoring in Group 1, the evaluations at 0 and 5 minutes were seen to be in agreement with Flora et al. (2020). The attitude value in Apgar scores at 0, 5 and 15 minutes was found to be lower in Group 2, which was thought to be due to the fact that mothers with dystocia did not take care of their offspring as a result of fatigue. Pulse was used to assess neonatal viability in the current study, similar to previous studies of horses (Vaala et al., 2002), dogs (Veronesi et al., 2009), donkeys (Bonelli et al., 2020), and sheep (Dutra ve Banchemo, 2011). The data available in the literature for small ruminant newborn heart rates vary significantly between (mean \pm standard deviation) 92 ± 42 and 151 ± 47 (Koether et al., 2016; Vannucchi et al., 2012). In Group 1 in the current study, 45% had a pulse score of 2 (>175 beats/min) and 55% had a pulse score of 1 (100-175 beats/minute) at minute 0. At 5 minutes, 65% had a pulse score of 2 (>175 beats/minute) and 35% had a pulse score of 1 (100-175 beats/minute). At 15 minutes, 75% had a pulse score of 2 (>175 beats/minute) and 25% had a pulse score of 1 (100-175 beats/minute). The evaluations of heart rate in Apgar scoring in Group 1 at 0 and 5 minutes were seen to be in agreement with the

literature data (Vannucchi et al., 2012; Flora et al., 2020). In addition, heart rate was found to be higher in Group 1, which was attributed to the fact that the kids did not show any respiratory and cardiovascular system problems in eutocia. In the current study, the total Apgar scores tended to increase in both groups during the first 15 minutes after birth. This finding is supported by the increase in mean Apgar scores in human infants from 6.2 to 7.4 at 5 to 60 minutes after birth (Batista et al., 2014) and by the total Apgar score in piglets increasing from 7 to 9 over time (De Roth ve Downie, 1976). This was thought to be due to intrapartum hypoxia as a result of prolonged stay in the birth canal, which initially caused low Apgar scores and could be improved by the newborn's adaptation to extrauterine life.

Postnatally increased pCO_2 has been reported in newborn lambs (Vannucchi et al., 2012). In the current study, pCO_2 levels were found to be high in both groups and were higher in Group 2. The reason for this was thought to be due to hypoxia due to the prolonged stay in the birth canal due to dystocia. It has been stated that the low pO_2 value in newborns may be due to the decrease in oxygen exchange between the alveoli and pulmonary capillaries in the placenta during delivery (Vannucchi et al., 2012). Uterine contractions that occur during labor cause compression of the uterine artery and umbilical cord, resulting in a major reduction in placental and umbilical blood flow (Siristatidis et al., 2003). In the present study, pO_2 levels were found to be low in both groups, and the pO_2 level was measured lower in Group 2 than in Group 1. It has been reported that postnatal hypercapnia and respiratory acidosis are seen in newborn lambs (Vannucchi et al., 2012). In the current study, lower pH and higher pCO_2 were determined in Group 2, and it was determined that the newborn kids had respiratory acidosis. Dystocia is often associated with prolonged hypoxia and acidosis (Lester et al., 2009). Neonatal pulmonary

changes due to dystocia cause progressive hypoxemia and hypercapnia (Bleul et al., 2007). The level of hypoxia and acidosis may vary depending on the onset of spontaneous breathing and the time it takes for the mother to completely leave the fetal bloodstream (Reece, 2004). It has been reported that there is no significant difference in pH, pCO₂, pO₂ and HCO₃ levels at 0 and 24 hours in calves with dystocia compared to calves with eutocia (Feitosa et al., 2012). In another study, it was found that foals and lambs born as a result of dystocia had low pH and HCO₃ levels, and the improvements in blood gases were similar on the 1st day, according to those results, it was reported that in foals born as a result of dystocia there were negative effects on blood gases (Aydoğdu et al., 2018; Kimura et al., 2017). In the present study, the blood gas values of pH and HCO₃ were found to be low in the group with dystocia, and the difference was determined to be statistically significant, consistent with the literature. In addition, in the eutocia group, a positive correlation was determined between the total Apgar score and HCO₃-15 values at 0 and 5 minutes, and it was noted that the Apgar score increased as HCO₃ increased. Similarly, in the dystocia group there was observed to be a negative correlation between the 0-minute total Apgar score and the 5th minute HCO₃ values, with a decrease in the total Apgar score as HCO₃ increased.

CONCLUSION

In conclusion, the results of this study demonstrated that in kids with dystocia there were negative effects on the total Apgar score and blood gases. It was also concluded that the qualitative evaluation of the Apgar score together with the quantitative blood gas measurements will provide more information in terms of intervention in newborns, serious problems can be prevented, and negative effects can be minimized with early interventions. As there was a significant correlation in the Apgar

scoring of HCO₃ from blood gas measurements, it was deduced that it should be supported by more comprehensive studies.

ACKNOWLEDGMENT

Ethical approval: Studies were performed by Harran University Local Ethics Committee for Animal Experiments (07.09.2020-No: 2020/004).

Conflict of interest: There is no conflict of interest between the authors

KAYNAKLAR

- Aydoğdu, U., Coskun, A., Yüksel, M., Basbug, O., Agaoglu, Z.T. (2018).** The effect of dystocia on passive immune status, oxidative stress, venous blood gas and acid-base balance in lambs. *Small Ruminant Research*, 166, 115-120. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2018.06.006
- Apgar, V. A. (1953).** Proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Current Research in Anesthesia and Analgesia*, 32, 260-7.
- Batista, M., Moreno, C., Vilar, J., Golding, M., Brito, C., Santana, M., Alamoet, D., (2014).** Neonatal viability evaluation by APGAR score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). *Animal Reproduction Science*, 146, 218-26. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.03.003
- Bleul, U., Lejeune, B., Schwantag, S., Kahn, W. (2007).** Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. *Veterinary Record*, 161, 688-91.
- Bonelli, F., Nocera, R., Conte, G., Panzani, D., Sgorbini, M. (2020).** Relation between Apgar scoring and physical parameters in 44 newborn Amiata donkey foals at birth. *Theriogenology*, 142, 310-4. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.10.020
- Born, E. (1981).** Untersuchungen über den Einfluss der Schnittentbindung auf die Vitalität neugeborener Kälber. Dissertation. Tierärztliche Hochschule, Hannover, Germany.
- Camargo, D.G., Yanaka, R., Bovino, F., Bregadioli, T., Mendes, L.C.N., Peirão, J.R., Feitosa, F.L.F. (2012).** Parâmetros hemogasométricos e equilíbrio ácido-básico de cabritos nascidos de partos normais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 9-14.
- De Roth, L., Downie, H.G. (1976).** Evaluation of viability of neonatal swine. *Canadian Veterinary Journal*, 17, 275-9.
- Dutra, F., Banchero, G. (2011).** Polwarth and Texel Ewe parturition duration and its association with lamb birth asphyxia. *Journal of Animal Science*, 89, 3069-78. doi: 10.2527/jas.2010-3567

- Dwyer, C.M. (2008).** The welfare of the neonatal lamb. *Small Ruminant Research*, 76, 31-41.
- Dwyer, C.M., Conington, J., Corbiere, F., Muri, K., Nowak, R., Rooke, J., Vipond, J., Gautier, J.M. (2016).** Invited review: improving neonatal survival in small ruminants: science into practice. *Animal*, 10,449-59.
- Feitosa, F.L.F., Perri, S.H.V., Bovino, F., Mendes, L.C.N., Peiró, J.R., Gasparelli, E.R.F., Yanaka, R., Camargo, D.G. (2012).** Evaluation of the vitality of nelore calves born of normal or dystocic parturitions. *Ars Veterinaria*, 28, 1-7.
- Flora, T., Smallman, M., Kutzler, M. (2020).** Developing a modified Apgar scoring system for newborn lambs. *Theriogenology*, 157, 321-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.08.010
- Gilstrap, L.C., Leveno, K.S., Burris, J., Williams M.L., Little B.B. (1989).** Diagnosis of birth asphyxia on the basis of fetal pH; Apgar score and newborn cerebral dysfunction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161, 825-30. doi: 10.1016/0002-9378(89)90410-9
- Kimura, Y., Aoki, T., Chiba, A., Nambo, Y. (2017).** Effects of dystocia on blood gas parameters, acid-base balance and serum lactate concentration in heavy draft newborn foals. *Journal of Equine Science*, 28, 27-30.
- Koether, K., Ulian, C.M., Lourenço, M.L., Gonçalves, R.S, Sudano, M.J, Cruz, R.K.S., Branchini, N.S., Alfonso, A., Chiacchio, S.B. (2016).** The normal electrocardiograms in the conscious newborn lambs in neonatal period and its progression. *BMC Physiology*, 16. doi: 10.1186/s12899-016-0020-5.
- Kredatusova, G., Hajurka, J., Szakalova, I., Valencakova, A., Vojtek, B. (2011).** Physiological events during parturition and possibilities for improving puppy survival: a review. *Veterinární medicína*, 56, 589-94.
- Lester, G.D., House, J.K., Vaala, W.E. (2009).** Initial management and physical examination of the neonate. In: B.P. Smith (Ed.), *Large Animal Internal Medicine* (pp. 262-280). Mosby Elsevier, St. Louis.
- Nelson, K.B., Ellenberg, J.H. (1981).** Apgar scores as predictors of chronic neurologic disability. *Pediatrics*, 68, 36.
- Norton, J.R., Jackson, P.G., Taylor, P.M. (1998).** Measurement of arterial oxygenhaemoglobin saturation in newborn lambs by pulse oximetry. *Veterinary Record*, 142, 107-9. doi: 10.1136/vr.142.5.107
- Piccione, G., Borruso, M., Fazio, F., Giannetto, C., Caola, G. (2007).** Physiological parameters in lambs during the first 30 days postpartum. *Small Ruminant Research*, 72, 57-60. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.04.002
- Randall, G.C. (1971).** The relationship of arterial blood pH and pCO₂ to the viability of the newborn piglet. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 35,141-6.
- Reece, W.O. (2004).** *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 12th ed. Cornell University Press, Ithaca.
- Scott, P.R. (2006).** *Sheep Medicine*, 1st ed. Manson Publishing Ltd., London.
- Siristatidis, C., Salamalekis, E., Kassanos, D., Loghis, C., Creatsas, G., (2003).** Evaluation of fetal intrapartum hypoxia by middle cerebral and umbilical artery Doppler velocimetry with simultaneous cardiotocography and pulse oximetry. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 270, 265-70.
- Thorpe, J.A., Sampson, J.E., Parisi, V.M., Creasy, R.K. (1989).** Routine umbilical cord blood gas determinations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161, 600-5. doi: 10.1016/0002-9378(89)90362-1
- Türkoğlu, N., Yalçınöz, B. H., Küçüköğlü, S. (2014).** Sağlıklı ve hasta bebeğe sahip annelerin doğum sonu depresyon düzeylerinin karşılaştırılması, *Cumhuriyet Hemşirelik Dergisi*, 3(1), 1-8.
- Vaala, W.E., House, J.K., & Madigan, J.E. (2002).** Initial management and physical examination of the neonate. In: B.P. Smith (Ed.), *Large animal internal medicine* (pp. 277-93). Third ed. St. Louis: Mosby.
- Vannucchi, C.I., Rodrigues, J.A., Silva, L.C.G., Lucio, C.F., Veiga, G.A.L. (2012).** A clinical and hemogasometric survey of neonatal lambs. *Small Ruminant Research*, 108, 107-12.
- Vassalo, F.G., Peternelli Silva, L., Lourenço, M.L.G., Chiacchio, S.B. (2014).** Apgar score: history and importance in Veterinary Medicine. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38, 54-59.
- Vassalo, F.G., Simoes, C.G.B., Sudano, M.J., Prestes, N.C., Lopes, M.D., Chiacchio, S.B., Lourenço, M.L.G. (2015).** Topics in the routine assessment of newborn puppy viability. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30, 16-21. doi: 10.1053/j.tcam.2015.02.003
- Veronesi, M.C., Panzani, S., Faustini, M., Rota, A. (2009).** An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*, 72, 401-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.03.010

Tatlı su midyelerinin (*Unio terminalis*) erkek ve dişi bireylerinde kondisyon faktörünün boy gruplarına göre incelenmesi

Examination of condition factor in male and female of freshwater mussels (*Unio terminalis*) according to size groups.

ÖZET

Gölbaşı Gölü'nde (Hatay) bulunan *Unio terminalis*'in erkek ve dişi bireylerinde faktörü, bir yıl süresince boy gruplarına göre belirlenmeye çalışılmıştır. Başlangıç ayı Ekim olmak üzere 12 ay boyunca Gölbaşı Gölünden temin edilen *U. terminalis*'in erkek ve dişi bireylerinde uzunluk, genişlik ve yükseklik değerlerine bağlı olarak midye kabuk hacmi hesaplanmıştır. Midyelerin kabuktan ayrılmış yaş et ağırlıkları erkek ve dişi bireyler için belirlenerek aylara ve boy gruplarına göre kondisyon faktörü tespit edilmiştir. Erkek ve dişi midyelerde boy gruplarına göre kondisyon faktörü karşılaştırıldığında, erkeklerin 4,50 - 4,99 cm boy grubunda $17,79 \pm 1,46$; dişi midyelerin 5,50 - 5,99 cm boy grubunda $19,76 \pm 1,72$ olduğu tespit edilmiştir. 12 aylık inceleme sürecinde kondisyon faktörünün erkek ve dişi midyelerde ağustos ayında en yüksek, Ekim ayında ise en düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma Gölbaşı Gölü'nde yaygın olarak bulunan *U. terminalis*'in kondisyon faktörü tespiti konusunda yapılmış ilk incelemedir.

Keywords: Gölbaşı Gölü, kondisyon faktörü, sıcaklık, tatlı su midyesi, *Unio terminalis*

ABSTRACT

Condition factor, which is an indicator of fatness, in male and female individuals of *Unio terminalis* in Gölbaşı Lake (Hatay) was tried to be determined according to their height groups for one year. Mussel shell volume was calculated based on the length, width and height values of male and female *U. terminalis* obtained from Gölbaşı Lake for 12 months, starting from October. The wet meat weights of the mussels separated from the shell were determined for male and female individuals, and the condition factor was determined according to the months and length groups. Condition factors of male and female mussels were compared according to size groups. Condition factor was found to be 17.79 ± 1.46 in the 4.50 - 4.99 cm height group of men. It was determined that female mussels were 19.76 ± 1.72 in the 5.50 - 5.99 cm length group. It was determined that the condition factor in male and female mussels was highest in August and lowest in October during the 12-month examination period. This study is the first study to determine the condition factor of *U. terminalis*, which is common in Gölbaşı Lake.

Keywords: Condition factor, freshwater mussel, Gölbaşı Lake, temperature, *Unio terminalis*

GİRİŞ

Çift kabuklu biyolojisi çalışan araştırmacıların çoğu kabuklu su ürünleri için kondüsyon kavramını, et içeriğinin ölçümü olarak kullanmaktadır (Hickman ve Illingworth, 1980).

How to cite this article

Sereflışan, H. (2021). Examination of condition factor in male and female of freshwater mussels (*Unio terminalis*) according to size groups. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 220-227. <https://doi.org/10.31797/vetbio.954339>

Research Article

Hülya Şereflışan

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

ORCID-

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

Correspondence

Hülya ŞEREFLİŞAN

hulya.sereflisan@iste.edu.tr

Article info

Submission: 18-06-2021

Accepted: 28-10-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



Bilimsel araştırmalarda yer alan kondisyon faktörü, hem birey bazında hem de popülasyonu ifade eden bazda ölçülebilmekte ve bireysel ölçümler daha çok tercih edilmektedir (Gosling, 1992). Kondisyon Faktörü (KF) ekolojik ve fizyolojik bir kavram olup, canlının sağlık durumu, büyüme, et verimi, cinsiyet olgunluğu ve çevresel stres etkisini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zeng ve Yang, 2020). Çift kabuklu sınıfına giren canlılar çok çeşitli kabuk şekli, büyüklüğu, ağırlığı ve hacmine sahip olduğu için çift kabuklular, KF hesaplaması için farklı hacimsel veya gravimetrik ölçümler tercih edilmektedir. Özellikle, ağır kabuk yapısına sahip olan istiridye gibi çift kabuklularda KF hesaplaması için toplam kabuk veya et ağırlığının olduğu mevcut denklemler kullanılmaktadır (Lucas ve Beninger, 1985; Monteforte vd., 2000).

Midyelerde kondisyon faktörünü, vücut büyüklüğüne bağlı olarak yeterli besin düzeyi, su yüzeyinin dışında kalma süresi ve diğer çevresel faktörler de etkilemektedir (Karayücel ve Karayücel, 1997). Sıcaklık, tuzluluk, besin temininin karşılıklı etkileşiminden dolayı mevsimsel değişimler, üreme dönemi ve somatik büyüme de bu durumu etkileyen önemli unsurlardır (Bayne vd., 1984; Austin vd., 1993). Genel olarak, hayvanlarda KF vücut kütlesi ve boyutları arasındaki ilişkiye dayanmaktadır. Midyelerin besili durumunu gösteren kondisyon faktörü, bir popülasyonda ticari et kalitesindeki farklılıkları ölçmede oldukça önemlidir. Çift kabuklular için somatik ve üreme bölümleri arasındaki fizyolojik dengenin kondisyon faktörü açısından önemli olduğu bildirilmektedir (Wada vd., 1988). Fizyolojik koşullara ve çevresel parametrelerdeki değişikliklere bağlı olarak çift kabuklu yumuşakçalarda et içeriğinde nispeten büyük değişiklikler meydana geldiği (Wilbur ve Owen, 1964) ve midyelerin besin materyali olan klorofil-a ve asılı organik maddenin mevsimsel değişiminin midyelerde kondisyon indeksi üzerinde etkili olduğu

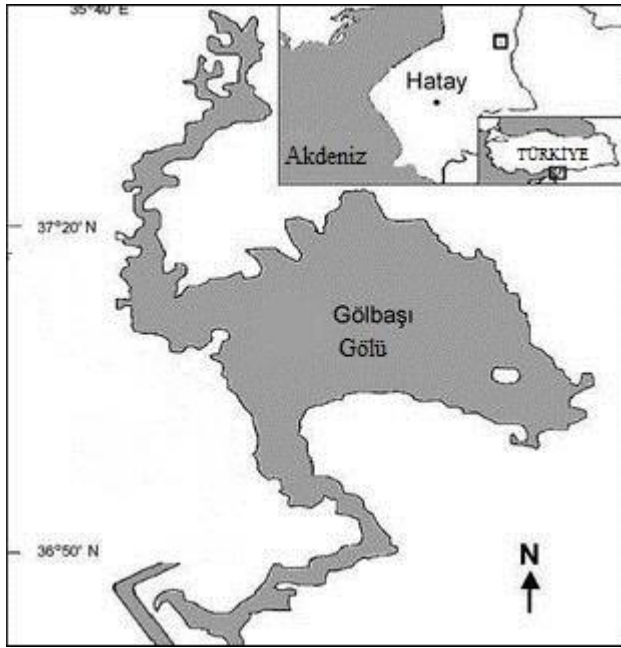
belirtilmektedir (Okumuş, 1993). Midyelerde KF çeşitli araştırmacılar tarafından farklı formüllerle yorumlanmıştır. Kondisyon faktörünü birbirinden farklı yapan unsurlar, kuru veya yaş et ağırlığı ile kabuk hacminin mm^3 , ml veya g cinsinden ifade edilmesidir. Yapılan araştırmalara göre, istatistik hesaplamalar sonucunda kuru ve yaş doku ağırlığının kullanımı arasında önemli bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Bu konuda Wada vd. (1988) kabuk hacmini mililitre (ml) olarak formüle edilmesini Monteforte vd. (2000) ise kondisyon faktörünü hesaplarken kabuk hacmini milimetre küp [$\text{mm}^3 = \text{Uzunluk (mm)} \times \text{Yükseklik (mm)} \times \text{Genişlik (mm)}$] olarak hesaplanmasını önermişlerdir.

Bu çalışma, Gölbaşı Gölü'nde (Hatay) mevcut olan *Unio terminalis* türü tatlı su midyesinin kondisyon faktörünün belirlenmesi konusunda yapılmış ilk araştırma olup midye istihsali için yol gösterici bir nitelik taşımaktadır.

MATERYAL VE METOT

Deneme Yeri

Araştırma, Haziran 2001 ile Nisan 2002 tarihleri arasında Gölbaşı Gölü'nde (Kırıkhan/HATAY) yapılmıştır (Şekil 1). Gölbaşı gölü, Amik gölü kurutulduktan sonra oluşturulmuş, Hatay ilinin kuzeydoğusunda yer alan, Kırıkhan'a 10 km, Antakya'ya 50 km uzaklıkta bulunan bir göldür. Yüzey alanı yaklaşık 12.000 dönüm olan bu gölün, 4.000 dönümü sulak sazlık alanlardan oluşmaktadır. Bölgede sulama amaçlı olarak kullanılan bu göl, çevresindeki tepelerin altından ortaya çıkan kaynak suları ile beslenmektedir. Bu kaynak sularının toplam debisi yaklaşık 2,5-3 m^3/sn .dir. Yazın sulama mevsiminden sonra geriye kalan gölün maksimum derinliği 4 m olup, ortalama derinlik 1-1,5 m civarındadır. Kış mevsiminde ise maksimum derinlik 6 m olup, ortalama derinlik yaklaşık 3,5-4 m'dir.



Şekil 1. Midye örneklerinin temin edildiği Gölbaşı Gölü (Hatay)

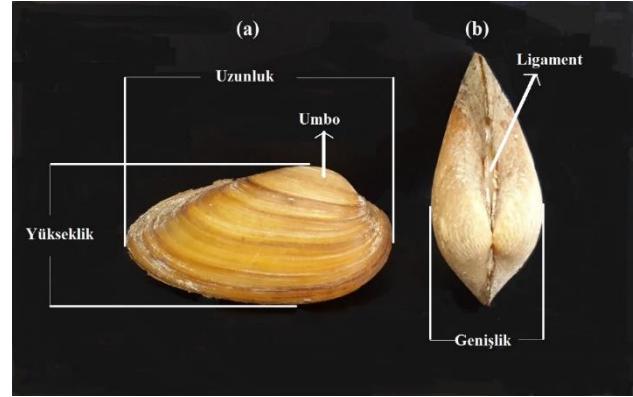
Unio terminalis'in toplanması

Midye örnekleri gölün her bölgesinden rastgele ve dağınık olarak alınmıştır. Örnek toplamada çeşitli büyüklükte kepçe, dreç ile 3 m uzunluğunda fiber tekne kullanılmıştır. Toplanan örnekler, eleklerde yıkanarak çamurdan arındırılmış ve ergin olanları tercih edilmiştir. 12 ay boyunca yaklaşık aynı büyüklükte ve olgunluktaki *U. terminalis*'ten her ay 20 adet toplanmıştır.

Biyometrik ölçümler

Midyelerin kabuk uzunluğu; valfin anterior kenarından posterior kenarına olan mesafesidir. Kabuk yüksekliği; valfin dorsal kenarından, ventral kenarına kadar olan mesafesidir. Kabuk genişliği ise, yatay olarak tutulan midyenin iki valf arası umbo yüksekliği olarak Zeng ve Yang, (2020)'a göre ölçülmüştür (Şekil 2). Bu ölçümlerde 0,05 mm hassasiyetli kumpas kullanılmıştır. Canlı ağırlık alınmadan önce, her bir midye örneğinin kurutma kâğıdı ile suyu alınmış, daha sonra valflerin anterior ve posterior kapama kasları kesilerek birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Kabuk ve et ağırlık ölçümü 0,01g hassasiyetli dijital terazi ile yapılmıştır. Bu ölçümler alınırken her bireye aynı muamele

uygulanmış, bu işlemler 12 ay boyunca aylık olarak 20 ergin bireyde tekrarlanmıştır.



Şekil 2. *Unio terminalis*'in vücut uzunluğu, yüksekliği (a) ve genişliği (b) ölçümünün şematik görüntüsü

Kondüsyon Faktörü

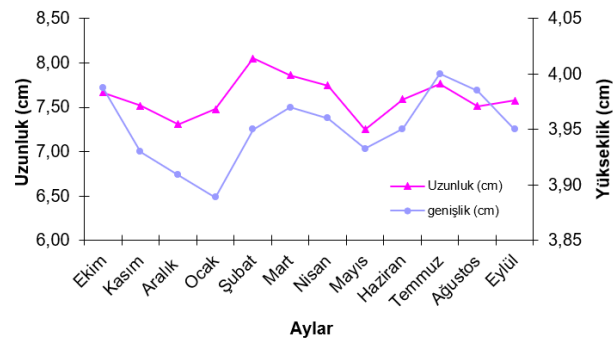
Canlıların beslenme aktivitesindeki aylık ve mevsimsel değişmelerin izlenmesinde, kondisyon faktöründen yararlanılmaktadır. Kondisyon faktörü, aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Monteforte vd., 2000).

$$\text{Kondüsyon Faktörü (KF)} = [\text{Yaş yumuşak doku (g)} / \text{Kabuk hacmi (mm}^3\text{)}] \times 100$$

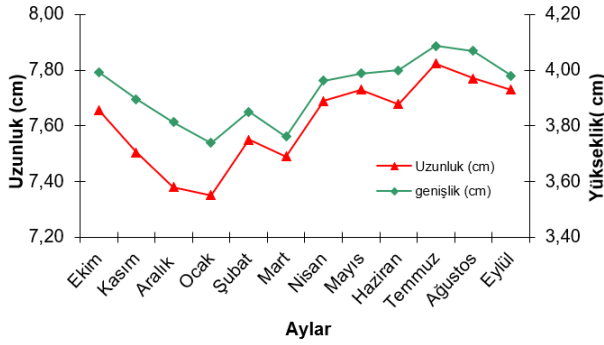
BULGULAR

Erkek ve Dişi Midyelerde Uzunluk ve Yükseklik Bulguları

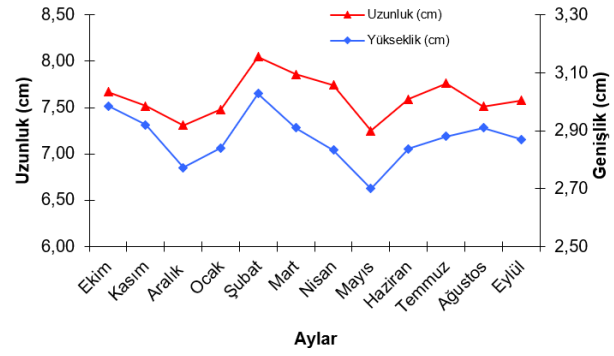
Uzunluk ve genişlik ölçümü midyelerde büyümeyi gösteren iki önemli belirteçtir. Erkek ve dişi midyelerde bir yıl süreyle yapılan ölçümler sonucunda, uzunluk ve genişlik değerleri arasında aylara göre paralel bir gidiş olduğu gözlenmiştir (Tablo 1.). Uzunluk arttıkça genişliğinde doğru orantılı bir biçimde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3;4.).



Şekil 3. Erkek midyelerin aylık uzunluk ve yükseklik değerleri



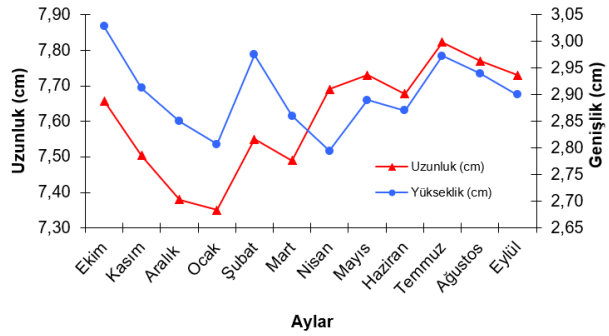
Şekil 4. Dişi midyelerin aylık uzunluk ve yükseklik değerleri



Şekil 5. Erkek midyelerin aylık uzunluk ve genişlik değerleri

Erkek ve Dişi Midyelerde Uzunluk ve Genişlik Bulguları

Erkek ve dişi midyelerde bir yıl boyunca yapılan örneklemeler sonucunda, aylara göre midye kabuğundaki yükseklik değerinin değişimi, midye uzunluğu ile paralel olduğu gözlenmiştir (Tablo 1.). Uzunluk arttıkça yüksekliğinde doğru orantılı bir biçimde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 5;6.).



Şekil 6. Dişi midyelerin aylık uzunluk ve genişlik değerleri

Table 1. Erkek ve dişi midyelerde yıllık uzunluk, genişlik ve yükseklik değerleri *

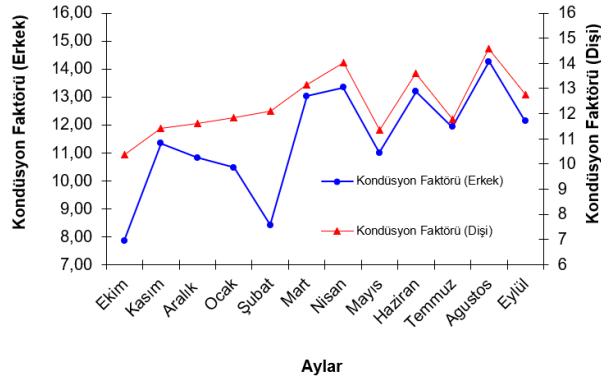
Aylar	Erkek Midyeler			Dişi Midyeler		
	Uzunluk (cm)	Yükseklik (cm)	Genişlik (cm)	Uzunluk (cm)	Yükseklik (cm)	Genişlik (cm)
Ekim	7,67 ± 0,69	3,99 ± 0,22	2,99 ± 0,32	7,66 ± 0,56	3,99 ± 0,21	3,03 ± 0,21
Kasım	7,52 ± 0,56	3,93 ± 0,15	2,92 ± 0,22	7,50 ± 0,50	3,90 ± 0,30	2,91 ± 0,30
Aralık	7,31 ± 0,70	3,91 ± 0,33	2,77 ± 0,26	7,38 ± 0,62	3,81 ± 0,43	2,85 ± 0,43
Ocak	7,48 ± 0,47	3,89 ± 0,36	2,84 ± 0,15	7,35 ± 0,51	3,74 ± 0,28	2,81 ± 0,28
Şubat	8,05 ± 0,51	3,95 ± 0,22	3,03 ± 0,16	7,55 ± 0,34	3,85 ± 0,27	2,98 ± 0,27
Mart	7,86 ± 0,41	3,97 ± 0,16	2,91 ± 0,23	7,49 ± 0,62	3,76 ± 0,20	2,86 ± 0,20
Nisan	7,74 ± 0,61	3,96 ± 0,27	2,83 ± 0,35	7,69 ± 0,70	3,96 ± 0,35	2,79 ± 0,35
Mayıs	7,25 ± 1,99	3,93 ± 1,05	2,70 ± 0,74	7,73 ± 0,51	3,99 ± 0,74	2,89 ± 0,74
Haziran	7,59 ± 0,32	3,95 ± 0,17	2,84 ± 0,13	7,68 ± 0,41	4,00 ± 0,21	2,87 ± 0,21
Temmuz	7,76 ± 0,64	4,00 ± 0,25	2,88 ± 0,26	7,82 ± 0,42	4,09 ± 0,19	2,97 ± 0,19
Ağustos	7,51 ± 0,45	3,99 ± 0,23	2,91 ± 0,24	7,77 ± 0,44	4,07 ± 0,18	2,94 ± 0,18
Eylül	7,58 ± 0,70	3,95 ± 0,27	2,87 ± 0,26	7,73 ± 0,42	3,98 ± 0,15	2,90 ± 0,15

* = Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir

Erkek ve Dişi Midyelerde Kondisyon Faktörü (KF)

Bir yıl boyunca erkek bireylerde hesaplanan kondisyon faktörü, en düşük Ekim ayında bulunurken, en yüksek değere ağustos ayında ulaşmıştır (Tablo 2.). Dişi midyelerde kondisyon

faktörü değeri, erkek midyelerde olduğu gibi Ekim ayında en düşük, ağustos ayında en yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Şekil 7.; Tablo 2.).



Şekil 7. Erkek ve dişi midyelerin aylık kondisyon faktörü değerleri

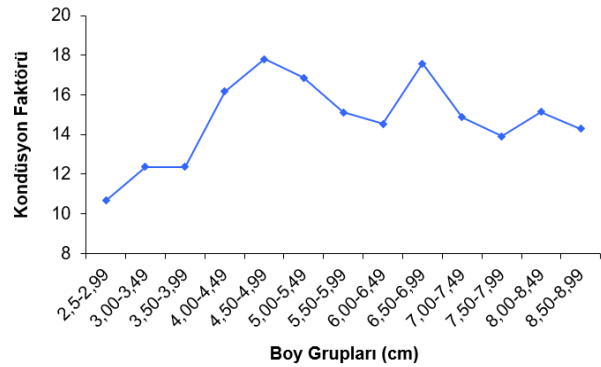
Tablo 2. Erkek ve dişi midyelerin yıllık sıcaklık değerlerine göre kondisyon faktörü ve et ağırlığı değerleri *

Aylar	Erkek Midyeler			Dişi Midyeler	
	Yaş Et Ağırlığı (g)	Kondisyon faktörü	Sıcaklık (°C)	Yaş Et Ağırlığı (g)	Kondisyon faktörü
Ekim	7,16±1,85	7,85±1,55	24,56±0,15	9,60±2,25	10,36±2,31
Kasım	9,67±2,81	11,34±2,61	17,17±0,07	9,71±1,79	11,40±1,29
Aralık	8,54±2,01	10,82±5,08	13,13±0,12	8,80±2,86	11,61±5,81
Ocak	8,65±1,94	10,47±2,04	10,59±0,16	8,38±1,68	11,83±1,70
Şubat	13,19±2,18	8,42±1,21	13,46±0,18	12,00±1,67	12,10±1,40
Mart	10,15±2,48	13,03±2,54	17,57±0,10	10,22±2,01	13,14±1,61
Nisan	11,68±1,33	11,33±1,63	21,61±0,07	12,07±3,19	14,03±2,09
Mayıs	8,47±3,14	11,00±3,20	22,54±0,08	8,89±1,94	11,35±1,60
Haziran	11,22±1,07	13,19±1,08	28,44±0,10	12,04±1,72	13,59±1,52
Temmuz	10,81±3,01	11,93±2,43	30,91±0,06	11,20±2,04	11,77±2,25
Ağustos	12,42±2,56	14,26±1,59	33,63±0,10	13,72±1,67	14,57±3,14
Eylül	10,82±2,57	12,13±3,31	28,84±0,12	11,80±2,41	12,76±2,05

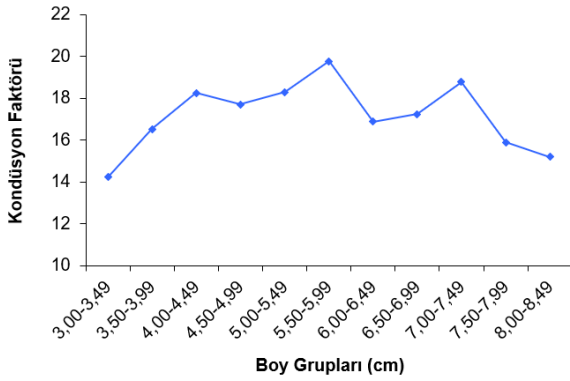
* = Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir

Erkek ve Dişi Midyelerin Boy Gruplarına Göre Saptanmış Olan Kondisyon Faktörü (KF) Değerleri

Erkek midyelerde kondisyon faktörü değerleri, 4,50-4,99 cm boy grubunda (Tablo 3.; Şekil 8.), dişi midyelerde ise 5,50-5,99 cm boy grubunda en yüksek değerde bulunmuştur (Şekil 9.; Tablo 3.).



Şekil 8. Erkek midyelerin boy gruplarına göre saptanmış olan kondisyon faktörü değerleri



Şekil 9. Dişi midyelerin boy gruplarına göre hesaplanmış olan kondisyon faktörü değerleri

Tablo 3. Erkek ve dişi midyelerin boy gruplarına göre kondisyon faktörü değerleri*

Boy Grupları (cm)	Kondisyon Faktörü (Erkek)	Kondisyon Faktörü (Dişi)
2,50 - 2,99	10,67 ± 2,10	–
3,00 - 3,49	12,36 ± 1,78	14,23 ± 1,63
3,50 - 3,99	12,37 ± 1,64	16,52 ± 1,38
4,00 - 4,49	16,16 ± 1,39	18,24 ± 1,42
4,50 - 4,99	17,79 ± 1,46	17,7 ± 1,49
5,00 - 5,49	16,86 ± 1,28	18,29 ± 1,61
5,50 - 5,99	15,12 ± 1,019	19,76 ± 1,72
6,00 - 6,49	14,53 ± 1,31	16,88 ± 1,36
6,50 - 6,99	17,58 ± 1,44	17,23 ± 1,57
7,00 - 7,49	14,87 ± 0,55	18,77 ± 1,89
7,50 - 7,99	13,91 ± 0,62	15,88 ± 0,48
8,00 - 8,49	15,13 ± 0,59	15,2 ± 0,52
8,50 - 8,99	14,29 ± 0,65	–

* = Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir

TARTIŞMA

Bir canlının şekli, boyutu, farklı büyüme özellikleri ve popülasyon ekolojileri hakkında bilgi sahibi olunduğu sürece, büyüme oranlarının tahmin edilmesi mümkündür. Çift kabuklularda da bu özelliklerin belirlenmesi çevresel faktörlerin bilinmesine bağlıdır. Özellikle midyelerin kabuk boyutu, çevresel faktörlerin farklı etkileşimlerden daha fazla etkilenmektedir (Seed 1968; Ramesha ve Thippeswamy, 2009). Aynı boydaki bazı bireylerin farklı ağırlık gösterdiği ve bu farklılıkların muhtemelen midyelerin fizyolojik durumundan ve çevresel parametrelerdeki farklılıklardan kaynaklandığı

düşünülmektedir (Seed 1976; Thippeswamy ve Joseph 1988). Organizmaların uzunluk ve ağırlıklarının, taksonomi karşılaştırmalarda yaşam öyküsü ölçüleriyle yüksek oranda ilişkili olduğu bildirilmektedir (Bonner 1965; Peter 1983). Midyeler yaşamları boyunca doğrusal olmayan yapılarını korumuşlardır (Ramesha ve Thippeswamy, 2009). Çift kabuklular için KF ilk olarak et kalitesi ve verimi için istiridye türlerinde tanımlanmış ve kullanılmıştır (Grave, 1912). Yapılan bir çalışmada, istiridyenin glikojen rezervlerini hesaplamak için yağlılık, besili durumu kondisyon faktörü niteliğinde kullanılmıştır (Mann, 1979). Omurgalı memelilerde KF, vücut büyüklüğündeki değişiklikler nedeniyle cinsiyet ve yaş sınıfları arasında farklılık gösterebilmektedir (Peig ve Green, 2010). Çift kabuklular için, erkek ve dişiler arasındaki vücut kütlesi ve boyutları genellikle önemli morfolojik farklılıklara sahip olmadığı (Tompa, Verdonk ve Van den Biggelaar, 1984), ayrıca allometrik büyüme de sergiledikleri belirtilmiştir (Gosling, 2003). Benzer şekilde, bu çalışmada erkek ve dişi midyelerin vücut ağırlığı üzerinden hesaplanan kondisyon faktörü değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Çift kabukluların et miktarını kabuk miktarıyla ilişkilendiren durum indekslerinin ölçümleri çeşitli bilimsel veya ticari amaçlar için kullanılmaktadır. Bu durum, özellikle çift kabukluların kalite değerlendirmesinde ve pazarlanmasında önemli bir konu olup et oranı ne kadar yüksekse o kadar iyi olduğu anlamını taşımaktadır. Midyelerde KF kabuğun büyüklüğüne, mevsime, çevresel faktörlere göre değişmekle birlikte ortamdaki gıda mevcudiyeti ve üreme aşamasına göre de değişebilmektedir (Gosling 1992; Zeng ve Yang, 2020). Aynı boyut ve yaştaki midyelerin kondisyon faktörü üzerinde ekolojik etkenlerin oldukça etkili olduğu bildirilmektedir (Zupan ve Saric, 2014). Başarılı bir üretim için yeterli yavru elde edilmesi ve yüksek yaşama oranı gibi çift kabuklu su ürünleri yetiştiriciliğinin temel koşullarının yanı sıra hızlı büyüme oranı ve KF düzeyinin yüksek olması da oldukça önemlidir.

Üretim sahalarının doğal potansiyelinden maksimum düzeyde yararlanılabilmesi için kondisyon faktörünün de iyi bir oranda olması gerekmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada bir yıl boyunca kondisyon faktörü, erkek ve dişi midye bireylerinde en yüksek değere ağustos ayında ulaştıkları tespit edilmiştir. Boy gruplarına göre bakıldığında, erkek midyelerde 4,50-4,99 cm, dişi midyelerde ise 5,50-5,99 cm boy grubunda KF değerleri en yüksek düzeyde bulunmuştur. Çift kabukluların maksimum ekonomik veriminde, et ağırlığı değerine bağlı olarak belirlenen KF büyük rol oynamaktadır (Çelik vd., 2009). Bu anlamda, Gölbaşı Gölü'nde yaygın olarak bulunan *U. terminalis*'in ekonomik verimliliği için en uygun dönem, su seviyesinin de düşük olduğu ağustos ayı olarak tespit edilmiştir.

AÇIKLAMALAR

Bu makale “Gölbaşı Gölü (Hatay)’nde Bulunan *Unio terminalis delicatus*’un Üreme Biyolojisi ve Yetiştiricilik Potansiyelinin Araştırılması 2003” başlıklı Doktora tezinin bir bölümünden hazırlanmıştır.

Etik onay: Makalede kullanılan midyeler için etik kurul belgesi gerekli değildir.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR

- Austin, H., Haven, D. S., & Moustafa, M. S. (1993).** The relationship between trends in a condition index of American oyster, *Crassostrea virginica* and environmental parameters in three. *Virginia Estuaries*, 16 (2), 362 – 374.
- Bayne, B. J., Klump, D. W., & Clarke, K. R. (1984).** Aspects of feeding, including estimates of gut residence time, in three mytilid species (Bivalvia, Mollusca) at two contrasting sites in the Cape Peninsula. *South Africa Oecologia. (Berlin)*, 64, 26 – 33.
- Bonner, J.T. (1965).** Size and cycle: an essay on the structure of biology, Princeton University Press, Princeton, USA.

- Çelik, M. Y., Karayücel, S., & Karayücel, I. (2009).** Effects of environmental factors on growth and mortality of raft cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) cultivated in lantern nets in BlackSea. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society*, 2(2), 97–108.
- Grave, C. (1912).** A manual of oyster culture in Maryland, The Fourth Report of the Maryland Shellfish Commission. The Fourth Report of the Maryland Shellfish Commission, pp. 1-75.
- Gosling, E. (1992).** The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol 25. Elsevier, Amsterdam, 589 pp.
- Gosling, E. (2003).** Growth. In E. Gosling (Ed.), *Marine bivalve molluscs* (pp. 203–242). Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd.
- Hickman, R. W., & Illingworth, J. (1980).** Condition cycle of the green-lipped mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. *Marine Biology*, 60(1), 27–38. https://doi.org/10.1007/bf_00395603.
- Karayücel, S., & Karayücel, İ. (1997).** Influence of environmental factors on condition index and biochemical composition in *Mytilus edulis* L. in cultivated – raft system, in two Scottish Sea Lochs. *Turkish Jour. Mar Sciences*, 3 (3), 149 – 166.
- Lucas, A., & Beninger, P. G. (1985).** The use of physiological condition indexes in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3), 187–200. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90243-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90243-1)
- Mann, R. (1979).** The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Biology and Ecology*, 38(2), 121-133.
- Monteforte, M., & Morales-Mulia, S. (2000).** Growth and survival of the Calafia mother-of-pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) under different sequences of nursery culture-late culture at Bahia de la Paz, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture Research*, 31, 901-915.
- Okumuş, İ. (1993).** Evaluation of suspended mussel (*Mytilus edulis* L.) culture and integrated experimental mariculture (salmon - mussel) trials in Scottish Sea Lochs. University of Stirling. PhD. Thesis; 336 pp.
- Peter, R.H. (1983).** The ecological implications of body size. Cambridge University Press, Cambridge.
- Peig, J., & Green, A. J. (2010).** The paradigm of body condition: A critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24(6), 1323–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751>.
- Ramesha, M.M., & Thippeswamy, S. (2009).** Allometry and condition index in the freshwater bivalve *Parreysia corrugata* (Muller) from river Kempuhole, India. *Asian Fisheries Science* 22, 203-214.
- Seed, R. (1968).** Factors influencing shell shape in mussel *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Assoc UK* 48,561–584.
- Seed, R. (1976).** Ecology In Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. IBP vol. 10. Cambridge University Press, pp. 13 – 65.

- Tompa, A. S., Verdonk, N. H., & Van den Biggelaar, J. A. M. (1984).** Reproduction, Vol. 7. Orlando, FL: Academic Press.
- Thippeswamy, S., & Joseph, M.M. (1988).** Seasonable variability in the condition of the wedge clam *Donax incarnates*(Gmelin). Proceedings, The First Indian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Indian Branch, Mangalore, pp. 247-249.
- Wada, K. T., Komura, A., & Uchimura Y. (1988).** Triploid production in the Japanese Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 76, 11-19
- Wilbur, K.M., & Owen, G. (1964).** Growth. In: Physiology of mollusca, (ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge). Vol. I; pp.211-242. Academic Press, New York.
- Zeng, Y., & Yang, H. (2020).** Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture Research*, 52,23–36.
- Zupan, I., & Saric, T. (2014).** Growth and condition index – two important factors in mussel farming, MESO: *The first Croatian Meat Journal*, 16(3), 275-278.

Seroepidemiological survey of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) infection amongst domestic ruminants in Adana province, East Mediterranean, Turkey

Research Article

Bilge Kaan Tekelioğlu^{1a}
Emre Ozan^{2b}
Armağan Erdem Ütük^{3c}
Ayca Hatice Atlı^{4d}
Harun Albayrak^{5e}
Mabrouk Elsabagh^{6f}
Mahmut Ali Gökçe^{7g}
Nevin Turut^{8h}
Omer Memduh Esendal⁹ⁱ
Mehmet Çelik⁹ⁱ

ABSTRACT

This study, thus, aimed to investigate the seroepidemiological status of Adana province for CCHFV in ruminants, according to species, breed, age, gender and geographical location. The study was carried out in 15 districts from sea level to plateaus (0-1472 m), within a 14,030 km² area. Total of 485 serum samples (165 cattle, 169 sheep and 160 goats) were collected from domestic ruminants. A modified human-based IgG ELISA kit was used for the detection of CCHFV specific antibodies in cattle, sheep and goats. Statistical analyses indicated a significant relationship between antibody presence and animal age, species, breed and location but there was no relation with animal gender. Out of 485 samples, 154 were seropositive (31.8%). It was determined that the statistical cluster varied between 5.8% and 74.3% according to location and seropositivity. The most important variable associated with antibody presence was geographic location. While high seropositivity is found at altitudes above 555 meters, it is found to be 7% and 3% at sea level. The results indicate that Adana province is at risk for CCHFV infection, especially in high altitude regions.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, ruminants, ELISA, seroepidemiology, Adana Province, East Mediterranean.

INTRODUCTION

Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) is considered to be one of the most medically important and highly pathogenic tick-borne zoonoses affecting humans, first seen in Crimea in 1944 and later in Congo in 1956 (Appannanavar and Mishra, 2011; Leblebicioglu et al., 2016). CCHFV is a negative-sense single-stranded RNA (ssRNA) virus and depicted for *Nairoviridae* family of *Bunyavirales* order and is widely distributed around the world (Appannanavar and Mishra, 2011; Leventhal et al., 2021). More than 10000 patients have been reported since the first CCHFV cases in Turkey in 2002 (Aydın and Coşkun, 2019; Leblebicioglu et al., 2016; Yılmaz et al., 2009). It has been reported that estimated subclinical infections in humans range from 88% and case fatality rates range from 5% to 40%. (Yılmaz et al., 2009; Gunaydın et al., 2010; Appannanavar and Mishra, 2011; Leblebicioglu et al., 2016; Bodur et al., 2012; Aydın and Coşkun, 2019). Veterinarians, health, agriculture and livestock workers have a higher risk of occupational infection and the route of transmission may vary (Al-Abri et al., 2017; Athar et al., 2005; Leblebicioglu et al., 2015).

How to cite this article

Tekelioğlu, BK., Ozan, E., Ütük, AE., Atlı, AH., Albayrak, H., Elsabagh, M., Gökçe, MA., Turut, N., Esendal, OM., Çelik, M. (2021). Seroepidemiological survey of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) infection amongst domestic ruminants in Adana province, East Mediterranean, Turkey. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 228-238. <https://doi.org/10.31797/vetbio.997150>

- ¹Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Virology Department, Adana, Turkey
²Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Virology Department, Samsun, Turkey
³Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Parasitology Department, Adana, Turkey
⁴Afyon Kocatepe University, Faculty of Science and Literature, Statistics Department, Afyon, Turkey
⁵Omer Halisdemir University, Faculty of Agricultural Science and Technology, Animal Production and Technologies Department, Nigde, Turkey
⁶Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Animal Husbandry and Welfare Department, Adana, Turkey
⁷Adana Veterinary Research Institute, Infectious Diseases Department, Adana, Turkey
⁸Near East University, Faculty of Veterinary Medicine, Microbiology Department Lefkoşe, Northern Cyprus Turkish Republic
⁹Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Food Hygiene and Technology Department, Adana, Turkey

ORCID-

^a0000-0001-6727-3175

^b0000-0001-9872-8152

^c0000-0002-7986-3583

^d0000-0002-4375-9733

^e0000-0002-4468-2790

^f0000-0002-0596-6547

^g0000-0002-8716-5996

^h0000-0003-2950-001X

ⁱ0000-0002-2700-2634

ⁱ0000-0003-4330-2490

Correspondence

Bilge Kaan Tekelioğlu
ktekelioglu@cu.edu.tr

Article info

Submission: 05-10-2021

Accepted: 07-11-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



Hard-shelled ticks, especially the *Hyalomma* genus, serve as both reservoirs and vectors for CCHF virus and transmission to humans mainly occurs through contact by infected ticks or blood or fluids from infected animals. Transmission also occurs in hospitals through contact with the blood or body fluids of an infected person, or through improper sterilization of medical equipment, reuse or accidental puncture of injection needles, and contamination of medical supplies (Leblebicioglu et al., 2014; World Health Organization, 2013).

In previous studies in Turkey, the genome segment of CCHFV was found in *R. bursa* and *H.m.marginatum* ticks collected from domestic ruminants in Kelkit valley (Tonbak et al., 2006). CCHFV specific antibodies were detected in cattle in the Central Anatolia region (Şevik, 2018) in sheep and goats in Northern Anatolia (Albayrak et al., 2012) and two isolates of CCHFV RNA in ticks on migratory birds were detected which is suggesting a role for ticks in CCHFV epidemics in Turkey and the spread of CCHFV by birds (Al-Abri et al., 2017).

There were no previous seroepidemiological data of CCHFV infection in ruminants in Adana province and was reported as CCHFV non-endemic region. In addition, sporadic human infections and deaths have been observed since 2015 (Kuşcu et al., 2017).

Numerous domestic and wild animals such as cattle, goats, sheep, rodents and birds serve as amplifying hosts for the CCHF virus. Ruminants harbor the virus, amplify it and develop specific antibodies; therefore, routine seroepidemiological surveillance studies with ELISA tests among ruminants in a particular endemic or non-endemic area and determining the prevalence of antibodies are accepted as the preferred basic research methods as an indicator of the presence of the virus in a particular region. (Commission decision, 1999, Mertens et

al., 2016; Schuster et al., 2016; Tuncer et al., 2014). Domestic ruminants in the pasture feeding in the districts of Adana province have been the focus of the sampling as an indicator of the presence of the circulating CCHF virus in this particular region. The novel ELISA methods modified from the CCHFV IgG ELISA technique in humans was reported to work in the serum of ruminants with high specificity and sensitivity (Mertens et al., 2015; Schuster et al., 2016). The aim was to determine the seroprevalance of CCHFV infection in pasture-fed domesticated ruminants according to species, breed, age, gender and geographical location in Adana province, Eastern Mediterranean zone, Turkey.

MATERIAL and METHOD

Study Area and Sampling

Adana province is located in the East Mediterranean region of Turkey and has a 14.030 km² surface area. The northern neighbor is The Central Anatolia, which is CCHFV endemic. *Kelkit Valley* is a transitional zone between Central Anatolia and the Black Sea regions geographically and Euro-Siberian and Irano-Turanian phytogeographically (Karaer& Kılınç, 2001). In the Northern Hemisphere, the transmission of CCHFV is common between May and September, with a peak incidence in June and July (Leblebicioglu et al., 2016). From the reported cases in Turkey, 68.9% had a history of tick-bite or contact and 84.1% were seen in May, June, and July (Yilmaz et al., 2009). Samplings were carried out during the tick season at this research and were collected from healthy animals.

Sampling was done at randomly chosen locations in 15 districts at varying altitudes from sea level to highlands (0-1472 m) within the province of Adana from pasture-fed ruminants with a high risk of tick contact from June 2016 to May 2017. After examining the health status, blood samples (n=485) were

collected from the jugular vein of 165 cattle, 169 sheep and 160 goats. In the Tufanbeyli district, additional blood samples were collected from ruminants in a village where the death cases were recorded in humans in July 2015 due to sporadic CCHFV infection.

Samples were kept in a cold chain, centrifuged at 2500 rpm for 15 minute to obtain the serum, and stored at -20 °C. Epidemiological data; age, breed, gender, geographical location and species were recorded for statistical analyses. The regions where sampling was done from sea level to highlands are Yumurtalık, Karataş, Ceyhan, Yüreğir, Seyhan, Çukurova, Sarıçam, İmamoğlu, Karaisalı, Kozan, Pozantı, Aladağ, Feke, Saimbeyli and Tufanbeyli, respectively.

Investigation of anti-CCHFV IgG

The modification and optimization of the ELISA assay were done by a commercial human CCHFV antibody kit and validated antibodies for animals. The conjugation of the test (anti-human IgG peroxidase) was replaced by cattle, sheep and goat conjugates (anti-Cow IgG peroxidase, anti-sheep IgG peroxidase and anti-goat IgG peroxidase). The commercial multi-species conjugate (ID.Vet Grabel, France) was used. Positive and negative serum samples were obtained from previous studies of Samsun Veterinary Control Institute and Ondokuz Mayıs University Faculty Veterinary Faculty. Two positive and two negative serum samples were used for each animal species independently. Vector Best, D-5052, Vecto Crimean-CHF-IgG ELISA kit (Vector Best, Novosibirsk, Russia) was used.

Validity

The negative controls average did not exceed the 0.250 OD value and the average of the positive controls was higher than the 1,000 OD value. The control samples used in the tests were determined according to the conditions

mentioned below. Serum samples were considered negative as equal to or less than 0.500 OD, suspicious as 0.500-0.800 OD, and positive as more than 0.800 OD. Both the validation processes and the evaluation of OD values were based on Mertens et al. (2015) and Schuster et al. (2016).

Data Statistical Analyses

Data were analyzed by R Statistics program. Data were evaluated with CHAID (Chi-squared Automatic Interaction Detection) analysis, estimates of combined categories and sub-groups of the variables predicted to be effective on antibody presence (location, species, breed, age and gender) were performed. Multiple correspondence analyses were performed to examine the pattern of the relationship between antibody presence and variables of geographical location, species, breed, age and gender. The relationship between the presence of antibodies against CCHFV and the variables of species, breed, age and gender was examined with CHAID analysis. The categorical result variable was considered as the dependent variable for CHAID analysis. Geographical location, species, breed, gender and age variables were considered as independent variables. To determine the relationship between variables, the CHAID analysis breaks down the population into separate sub-groups that are defined by a set of independent variables (Rokach&Maimon, 2008). The graphical procedures of multiple correspondence analyses are designed to describe the relationship between observations or variables and to reduce the dimension (Rencher, 2002).

RESULTS

Descriptive statistics according to the relation between antibody presence and variables of Adana city province districts sorted by altitudes in meters are presented in Table 1.

Table 1: Descriptive statistics of location; The districts are sorted to their altitude in meters.

Variable	Category	Altitude (m)	Frequency	Percentage	Positive Cases	Percentage
Location	Tufanbeyli	1415	35	7.2	26	74.3
	Saimbeyli	971	30	6.2	11	36.7
	Aladağ	858	30	6.2	14	46.7
	Pozantı	786	30	6.2	20	66.7
	Feke	558	30	6.2	15	50
	Karaisali	257	29	6.0	4	13.8
	Kozan	137	29	6.0	18	62.1
	Çukurova	120	31	6.4	5	16.1
	Sarıçam	120	60	12.4	14	23.3
	Imamoğlu	78	31	6.4	2	6
	Ceyhan	31	30	6.2	14	46.7
	Seyhan	28	30	6.2	6	20
	Yüreğir	26	30	6.2	2	7
	Karataş	11	30	6.2	1	3
	Yumurtalık	10	30	6.2	2	7

Descriptive statistics according to the relation between antibody presence and variables of species, breed, gender and age are presented in Table 2.

Table 2: Descriptive statistics of species, breeds, gender and age; sorted by the sampling frequency.

Variable	Category	Frequency	Percentage	Positive Cases	Percentage
Species	Cattle	165	34.0	36	23.3
	Sheep	160	33.0	61	39.6
	Goat	160	33.0	57	37.1
Breed	Holstein Cattle	117	24.1	10	8.5
	Anatolian Cattle	48	9.9	26	54.1
	Anatolian Sheep	79	16.3	36	45.6
	Ivesi Sheep	37	7.6	10	27.0
	Crossbred Sheep	44	9.1	15	34.1
	Turkish Saanen	26	5.4	6	23.1
	Ordinary Goat	87	17.9	44	50.6
	Aleppo Goat	28	5.8	1	3.6
	Crossbred Goat	19	3.9	6	31.6
Gender	Female	422	87.0	142	33.6
	Male	63	13.0	12	19.1
Age*	≤ 1	71	14.6	12	16.9
	1-5	324	66.8	109	33.6
	6-10	80	16.5	28	35.0
	≥ 10	10	2.1	5	50.0

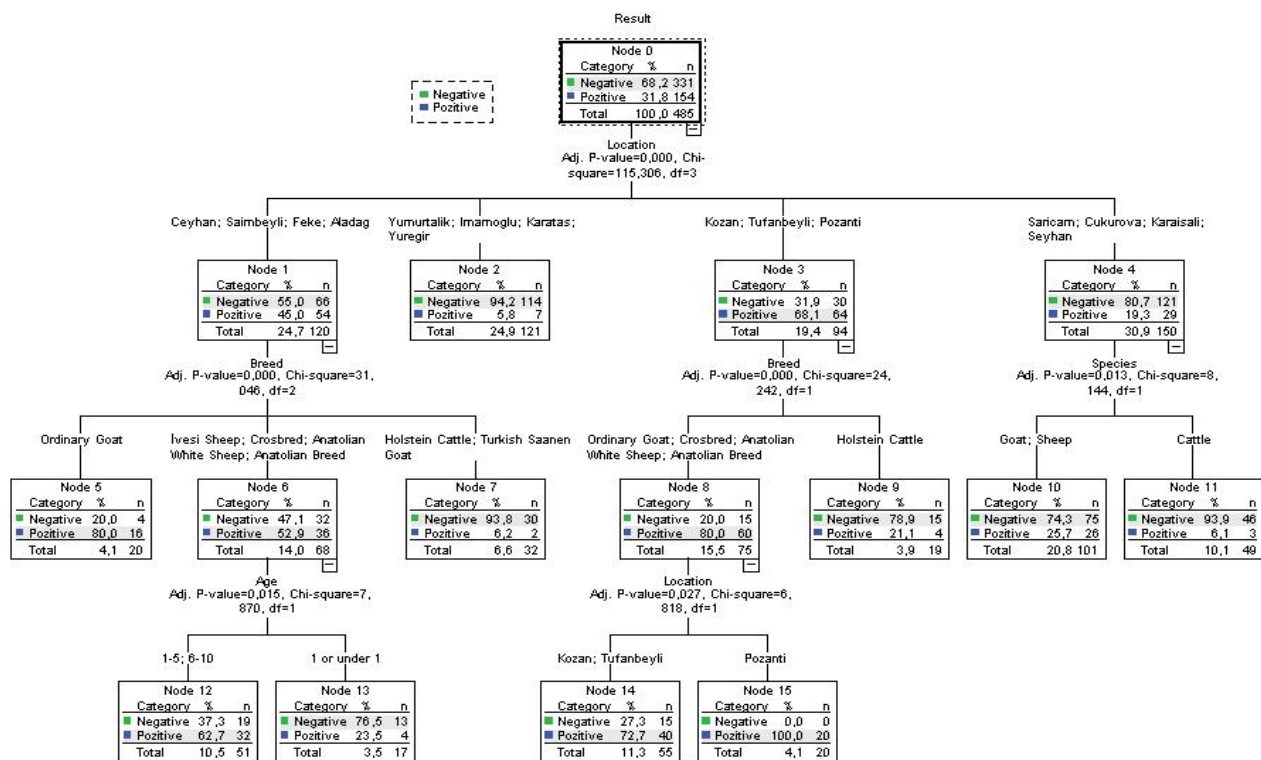
*Age category of sampled animals: ≤ 1 = Up to 1 year old, 1-5 = between 1 to 5 years old, 6-10 = between 6 to 10 years old, ≥ 10 = elder than 10 years old.

The CHAID analysis diagram where classifications are shown with nodes to identify relationships between variables is provided in Figure 1. The tree contains 15 child nodes for the independent variables of location, species, breed and age. The attribute with the highest Chi-square value (Chi-square=115.306; $p < 0.05$) among the independent variables, whose effect on antibody presence was found statistically significant, is placed in the first row in the CHAID diagram. Geographical location was

found the most significant variable related to antibody presence. The fourth node contains 150 (30.9%) samples collected from Sarıçam, Çukurova, Karaisali and Seyhan. The second node contains 121 (24.9%) samples collected from Yumurtalık, Imamoğlu, Karataş and Yüreğir. The first node contains 120 (24.7%) samples collected from Ceyhan, Saimbeyli, Feke and Aladağ. The third node contains 94 (19.4%) samples collected from Kozan, Tufanbeyli and Pozantı. The frequencies of

antibody observations in these nodes were 29, 7, 54 and 64, respectively.

Figure 1: Tree diagram of the relation between antibody presence and geographical location, species, breed and age



In the CHAID diagram, when the nodes in the second row were constructed, the relationship of the independent variables to the dependent variable was analyzed separately in four groups. Another statistically significant independent variable with the second-highest statistical relationship with the dependent variable was included for each node in the model. The variable that best explains the samples collected from Ceyhan, Saimbeyli, Feke and Aladağ is the breed (Chi-square=31.046; $p < 0.05$), which consists of three sub-groups. The sub-groups that best describe the antibody presence were the group of Ivesi 10 (2%), crossbred 15 (3.1%), and Anatolian breeds sheep 43 (8.9%); the group of Holstein cattle 32 (6.6%), Turkish Saanen and ordinary goat 20 (4.1%). The sub-group that best describes Ivesi, crossbred and Anatolian breeds sheep at these districts were the age data (Chi-square=7.870; $p < 0.05$), which is composed of

two sub-groups. Of these breeds, 51 (10.5%) of the samples were in the 1-5, 6-10 age range and included in the first sub-group; and 17 (3.5%) of them were 1 year old and younger and included in the second sub-group. The frequencies of antibody observations in these nodes were 32 and 4, respectively.

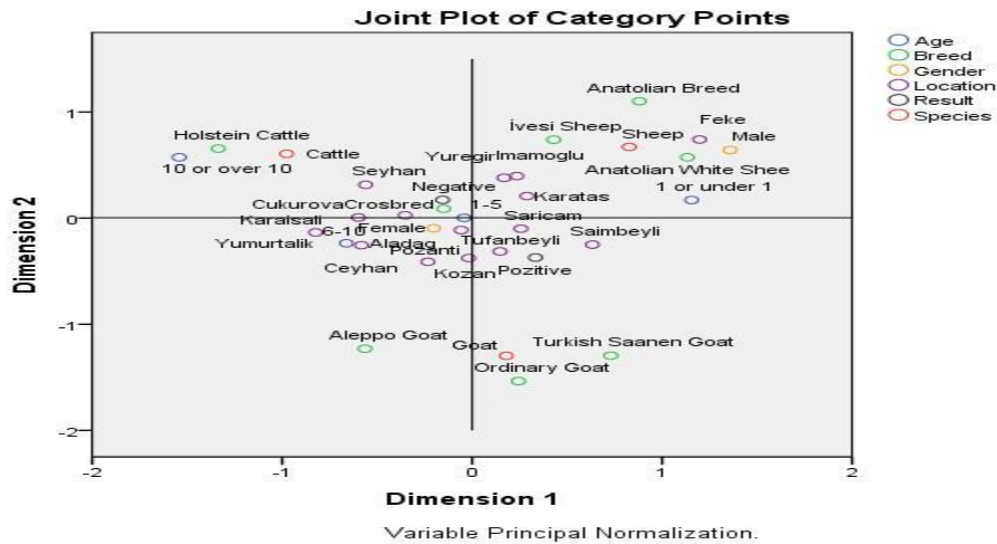
The variable that best explains the samples taken from Kozan, Tufanbeyli and Pozanti was the breed (Chi-square=24.242; $p < 0.05$), which heaped together in two sub-groups according to their breeds. 75 (15.5%) were the ordinary goat, crossbred and Anatolian breeds; and 19 (3.9%) Holstein cattle. The frequencies of antibody observations were 60 and 4, respectively. The variable that best explains samples taken from Kozan, Tufanbeyli and Pozanti was the location variable.

The variable that best explains the samples taken from Sarıçam, Çukurova, Karaisalı and Seyhan districts was the species (Chi-

square=8.144; $p < 0.05$) which consists of two sub-groups. While 101 (20.8%) of the samples belong to goats and sheep, which spend more time in the pasture than cattle and spread over

more areas between the plateau and the plain, 49 (10.1%) belong to cattle. The output for the multiple correspondence analyses is given in Figure 2.

Figure 2: Multiple correspondence analyses output.



Adana province map demonstrated in Figure 3. The results indicated the CCHFV exposure was varying at a mean value of 54.7%, 21.7%, 15% and 5.8% respectively at highlands

indicated in red, at midlands indicated in orange and yellow, and at coastal districts indicated in green color.

Figure 3: Adana province map. The mean CCHFV seroprevalence of 15 districts was 31.7%. In the red, orange, yellow and green regions in Figure 3, the maximum rates are 74.3%, 23.8%, 16.1% and 7%, and the minimum rates are 36.7%, 20%, 13.8% and 3%, respectively.



DISCUSSION

High CCHFV seropositivity ($n=154$) was detected with an average seroprevalance of 31.8% (154/485) in total. Seropositivity reached 100% in the village where human deaths were

observed in 2015 due to CCHFV infection and reached 74.3% in the Tufanbeyli district where this village is located. The results indicated the high exposure of these animals to the disease. The results of high seropositivity of CCHFV-specific antibodies in ruminants indicate a high risk of human infection. CHAID analysis

indicated a significant relation between antibody presence and each of age, species, breed and location, but no relationship was found between antibody presence and gender. Despite the lack of previous regional seroepidemiological studies on ruminants, Adana province was declared as a non-endemic region previously (Kuşcu et al., 2017). This inference was probably based on either lack of serologic surveillance study conducted on animals in the province or there was no reported human infection since 2015. In contrast, our results indicated that Adana province is at risk for CCHFV infection, especially in high altitude regions. In 2015, sporadic cases and human deaths were reported in Adana and human infections increases in Turkey (Leblebicioglu et al., 2016).

Adana province was identified as geographically high risk area in a study conducted with the spatial screening statistics (SaTScan) for CCHF infection cluster (Deka, 2017). Most of the CCHFV cases seen in Turkey have been associated with geographies dominated by mountainous lands bisected by riparian systems and scrub forests surrounding cultivated fields and pastures (Vatansever et al., 2007). Mediterranean basin, declared as suitable for ticks to survive as the vectors of CCHFV due to their climatic characteristics (Hoek et al., 2012). Similar to previous reports, our findings indicated that the high-altitude districts of Adana province with high seropositivity are located at the transition line with the Central Anatolia region and have similarities with CCHF infection endemic regions due to the geographical structure and ecological characteristics. The geospatial approach data reported by the spatial survey statistics and the maximum entropy modeling with environmental and geographical essential characteristics of CCHFV overlap with the high altitude regions of Adana province, which was sampled in this study.

Location; the most significant predictor of antibody presence was the geographical location. The node 1 consisted of Yumurtalık, İmamoğlu, Karataş and Yüreğir, node 2 consisted of Sariçam, Çukurova, Karaisalı and Seyhan, node 3 consisted of Ceyhan, Saimbeyli, Feke and Aladağ and node 4 consisted of Koazan, Tufanbeyli and Pozantı. The frequencies of antibody observations in these nodes were 7, 29, 54 and 64, respectively. The seropositivity was highest (i.e., 64%) at CCHFV endemic regions boundary districts as Tufanbeyli, Pozantı and Kozan followed by Saimbeyli, Feke, Aladağ and Ceyhan with 54% seropositivity.

Altitude; the highest seroprevalence was found at Tufanbeyli (74.3%) followed by Pozantı (66.6%), Kozan (62%), Feke (50%), Ceyhan (46.7%) and Aladağ (46.7%) which are located at the highlands except for Ceyhan and Kozan. Results indicated that districts located at highlands borders at endemic regions of Midland Anatolia have higher seropositivity and are similar to previous reports (Deka, 2017; Yilmaz et al., 2009). The seroprevalence was highest with an average of 68,1% at node 3 as Tufanbeyli, Kozan and Pozantı then followed by Node 2 which was the second-highest value in Aladağ and Feke with an average of 45%. Previous reports indicated that CCHFV infection in Turkey presenting a peak transmission in the early summer months and a strong association with living at an altitude greater than 836.5 meters. Seasonal transmission specifically between April and August (most frequent in July 2005 and June 2006) at moderate altitudes, typically around 1000 meters or higher, has been reported in other studies, presumably reflecting optimum conditions for tick populations (Deka, 2017; Kadanalı et al., 2009; Leblebicioglu et al., 2016). Günaydın et al. (2010) reported that none of the CCHFV human cases was from the geographical regions where mountainous lands faced the sea and all cases were from areas

situated at 1100-2265 m above sea levels. Our results are similar to previous studies; as districts located at altitudes above 555 m have higher seropositivity and districts with altitudes at sea level have lower seropositivity. Interestingly higher seropositivity was shown in two neighboring districts located at lower altitudes, 46.6% in Ceyhan (29 m) and 62% in Kozan (137 m). The reason might be the animal movement rather than the exposure to the infection. Domestic ruminants can play a role in both ways at spreading the disease without developing a symptomatic infection; by amplifying the virus as a host and transport the ticks as infection vectors at the pasture feeding between the plateaus and plains. Ceyhan and Kozan districts offer plenty of grassland after seasonal harvest for the traditional feeding of sheep and goats. The results verified our theory that there were no seropositive cattle at Ceyhan and 0.08% at Kozan. Yumurtalık and Karataş, have the lowest altitudes of 2 and 10 meters and are located in the coastal regions, represented 7% and 3% seropositivity, respectively. This finding indicates that there is a relationship between the geographic location and the spread of the disease, and might explain that the disease was never reported in Northern Cyprus Turkish Republic, which has similar sea level located geographical features with Yumurtalık and Karataş districts (Kasi et al., 2019). Animal movements from the highlands to the plains may pose a risk of spreading the infection and its vector.

Breed; The cattle, sheep and goats breeds of the CCHF-specific IgG antibodies seropositive animals at this study were 8.5% Holstein cattle and 54.1% Anatolian Cattle, 45.6% Anatolian sheep, 27.0% Ivesi sheep, 34.1% crossbred sheep, 23.1% Turkish Saanen goat, 50.6% ordinary goat, 3.6% Aleppo goat and 31.6% crossbred goat. Blanco-Penedo et al., (2021) reported findings of high seropositivity in native Boran (50.7%), Zebu (45.9%) breeds fed in the pastoral area in Kenya. The

seropositivity findings related to the breed were examined in our study; it was observed that Anatolian breeds had higher seropositivity than purebred cattle, sheep and goats. It was concluded that this finding may be related to the time spent in the pasture, exposure to the virus and its vector, age, sampling size, differences in care and nutrition, environmental conditions, and susceptibility to diseases.

Age; The age of the CCHF-specific IgG antibodies seropositive animals at this study were 50% at 10 years and older, 35% between 6-10 years old, 33.6% between 1-5 years old and 16.9% up to 1 year old. The findings we obtained in the study are consistent with previous studies of other researchers who reported that as the age increases, animals spend more time in the pasture and as a result, the probability of their exposure to infected ticks, the vector of the disease (Bartel et al., 2014, Gergova et al., 2012, Kasi et al., 2019, Şevik 2018).

Species; Previously reported CCHF-specific IgG antibodies in cattle were 17% in Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat and Yozgat cities in Turkey (Kırbaş 2010), 38.5% in Tokat city in Turkey (Özüpak 2017), 1.2% in the Central Anatolia and central-west part of the Aegean region of Turkey (Şevik 2018), 13% in the Marmara region of Turkey (Tuncer et al. 2014), 71% in Bulgaria (Barthel et al., 2014), 31% in Kosovo (Fajs et al., 2014) and 17.3% in the Vardar region of Republic of Macedonia (Mertens et al. 2015). Reported CCHF-specific IgG antibodies in sheep were 85.71% in Samsun, Tokat, Sinop and Sivas cities in Turkey (Albayrak et.al. 2012), 37% Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat and Yozgat cities in Turkey (Kırbaş 2010), 83.3% in Tokat city in Turkey (Özüpak 2017), 31.8% in the Marmara region of Turkey (Tuncer et al. 2014), 74% in Bulgaria (Barthel et al., 2014), 10% in Kosovo (Fajs et al., 2014), and %19 in Pakistan (Kasi et al. 2017). Reported CCHF-specific IgG antibodies in goats were 66.66% in Samsun,

Tokat, Sinop and Sivas cities in Turkey (Albayrak et.al. 2012), 82.8% in Tokat city in Turkey (Özüpak 2017), 66% in the Marmara region of Turkey (Tuncer et al. 2014), 60% in Bulgaria (Barthel et al., 2014), 20% in Kosovo (Fajs et al., 2014) and 5% in Pakistan (Kasi et al. 2017). In this study, CCHF-specific IgG antibodies seroprevalance was found to be 23.3% in cattle, 39.6% in sheep and 37.1% in goats. Serological results that differ in the studies of researchers can be explained by the presence of factors such as species, sampling sites, environmental and climatic changes, test methods, number of samples examined, and age of animals, presence and exposure of vectors. In our study, we found that the seropositivity was higher in sheep and goats than in cattle, which was similar to the findings of other researchers (Albayrak et.al. 2012, Barthel et al., 2014, Kırbaş 2010, Özüpak 2017, Schuster et al., 2016, Tuncer et al., 2014). Species based results are probably depends on various factors such exposure to the vector and as host preferences, sampling size, animal movements, feeding style and animal characteristics as the CCHF virus and its vectors may adapt to different geographical regions.

Gender; obtained results of CHAID analysis represented no statistically significant relationship between antibody presence and gender.

The overall strategy for establishing CCHFV surveillance programs should involve multidisciplinary research among veterinarians, parasitologists, epidemiologists, medical practitioners, ecologists, geographers and livestock workers in collaboration with public administrators. This study was designed to determine the exposure status of cattle, sheep and goats in Adana Province, Eastern Mediterranean zone of Turkey. The results indicate that Adana province is at risk for CCHF infection, especially in high altitude regions.

CONCLUSION

CCHFV is an important tick-borne zoonotic infection. It is known that CCHF virus and its vectors may differ and adapt to different geographical regions depending on various factors such as host selection, exposure to the vector, animal movements, migration and host preferences. The results highlight the suitability of ruminants for seroepidemiological CCHFV monitoring studies in a particular region where the presence or absence of CCHFV is unknown. In this study it has been determined that seropositivity increases at altitudes of 555 m and above, and decreases as it approaches sea level and it has been concluded that the high altitude regions of Adana province are at risk for the disease.

ACKNOWLEDGMENT

This project; TS-7862 was funded by Çukurova University Scientific Research Coordination Department. We would like to thank the animal owners, Adana and Samsun Veterinary Research Institutes, for their kind contribution. During the study, a high standard (best practice) veterinary care and informed customer approval were provided.

Ethical approval: Ethical clearance received from Adana Veterinary Research and Control Institute (2016/2890).

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

REFERENCES

- Al-Abri, S. S., Abaidani, I. A., Fazlalipour, M., Mostafavi, E., Leblebicioglu, H., Pshenichnaya, N., Memish, Z. A., Hewson, R., Petersen, E., Mala, P., Nhu Nguyen, T. M., Rahman Malik, M., Formenty, P., & Jeffries, R. (2017). Current status of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region: issues, challenges, and future directions. *International Journal of Infectious Diseases*, 58, 82-89. doi: 10.1016/j.ijid.2017.02.018
- Albayrak, H., Ozan, E., & Kurt, M. (2010). An antigenic investigation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in hard ticks from provinces in Northern Turkey. *Tropical Animal*

- Health and Production*, 42(7), 1323-1325. doi: 10.1007/s11250-010-9579-1
- Albayrak, H., Ozan, E., & Kurt, M. (2012).** Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in northern Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 44(7), 1667-1671. doi: 10.1007/s11250-012-0122-4
- Appannanavar, S. B., & Mishra, B. (2011).** An update on Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(3), 285-292. doi: 10.4103/0974-777X.83537
- Athar, M. N., Khalid, M. A., Ahmad, A. M., Bashir, N., Baqai, H. Z., Ahmad, M., Balouch, A. H., & Bashir, K. (2005).** Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002: contact tracing and risk assessment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 471-473. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.471
- Aydın, M. F. & Coşkun, A. (2019).** İnsanlarda kene ile bulaşan hastalık etkenleri ve Türkiye'deki mevcut durumu. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 4 (1), 26-32. DOI: 10.31797/vetbio.486679
- Barthel, R., Mohareb, E., Younan, R., Gladnishka, T., Kalvatchev, N., Moemen, A., Mansour, S.S., Rossi, C., Schoepp, R., Christova, I. (2014).** Seroprevalance of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Bulgarian livestock. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 28, 540-542.
- Blanco-Penedo, I., Obanda, O., Kingori, E., Agwanda, B., Ahlm, C., Lwande, O. W. (2021).** Seroepidemiology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in cattle across three livestock pastoral regions in Kenya. *Dairy*, 2, 425-434.
- Bodur, H., Akinci, E., Ascioğlu, S., Öngürü, P., & Uyar, Y. (2012).** Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 640-642. doi: 10.3201/eid1804.111374
- Commission Decision SANCO/B3/R11. (1999).** Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Diagnostic tests for Crimean Congo haemorrhagic fever [CCHF] in ratites. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate B-Scientific Health Opinions, Unit B3-Management of Scientific Committees II.
- Deka, M. A. (2017).** Crimean-Congo hemorrhagic fever geographic and environmental risk assessment in the Balkan and Anatolian Peninsulas. *Papers in Applied Geography*, 4(1), 46-71. doi: 10.1080/23754931.2017.1378122
- Fajs, L., Humolli, I., Saksida, A., Knap, N., Jelovšek, M., Korva, M., Dedushaj, I., Avšič-Županc, T. (2014).** Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in healthy population, livestock and ticks in Kosovo. *PLoS One*, 9:e110982.
- Gergova, I., Kunchev, M., Kamarinchev, B. (2012).** CrimeanCongo hemorrhagic fever virus-tick survey in endemic areas in Bulgaria. *J Med Virol*, 84, 608-614.
- Günaydın, S. N., Aydın, K., Yılmaz, G., Çaylan, R., & Köksal, İ. (2010).** Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in the eastern Black Sea Region of Turkey: demographic, geographic, climatic, and clinical characteristics. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40(6), 829-834.
- Hoek, M., Fischer, E., Hengel, R. V. D., Backer, J., Koeijer, A. D. (2012).** Workshop on a risk assessment of Crimen Congo Hemorrhagic fever in Western Europe. Central Veterinary Institute, Report number 12/CVI0361. Lelystad, The Netherlands.
- Kadanali, A., Erol, S., Özkurt, Z., & Özden, K. (2009).** Epidemiological risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever patients. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 39(6), 829-832.
- Karaer, F., & Kılınc, M. (2001).** The Flora of Kelkit Valley. *Turkish Journal of Botany*, 25(4), 195-238.
- Kasi, K. K., Sas, M. A., Sauter-Louis, C., Gethmann, J. M., Groschup, M. H., & Conraths, F. J. (2019).** Risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Livestock in Pakistan. *International Journal of Infectious Diseases*, 79(1), 137. doi: 10.1016/j.ijid.2018.11.335
- Kırbaş, A. (2009).** *Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat Ve Yozgat İllerindeki Sığır Ve Koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüs Enfeksiyonunun Seroprevalansının Araştırılması* (Publication No: 236097) [PhD Thesis, Fırat Üniversitesi] Fırat University Open Access Archive.
- Kuşcu, F., Kömür, S., Yağcı Çağlayık, D., Ulu, A., İnal, A. S., Kurtaran, B., Taşova, Y., Aksu, H. S. Z., & Özkul, A. (2017).** Is Crimean-Congo hemorrhagic fever virus topotype important in the possibility of nosocomial transmission? *Acta Medica Mediterranea*, 33(4), 575-580. doi: 10.19193/0393-6384_2017_4_084
- Leblebicioglu, H., Eroglu, C., Erciyas-Yavuz, K., Hokelek, M., Acici, M., & Yilmaz, H. (2014).** Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1331-1334. doi: 10.3201/eid2008.131547
- Leblebicioglu, H., Ozaras, R., & Irmak, H. (2016).** Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Research*, 126, 21-34. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.12.003
- Leblebicioglu, H., Sunbul, M., Memish, Z. A., Al-Tawfig, J. A., Bodur, H., Ozkul, A., Gucukoglu, A., Chinikar, S., & Hasan, Z. (2015).** Consensus report: Preventive measures for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever during Eid-al-Adha festival. *International Journal of Infectious Diseases*, 38, 9-15. doi: 10.1016/j.ijid.2015.06.029
- Leventhal, S. S., Wilson, D., Feldmann, H., & Hawman, D. W. (2021).** A Look into Bunyavirales Genomes: Functions of Non-Structural (NS) Proteins. *Viruses*, 13(2), 314. <https://doi.org/10.3390/v13020314>
- Mertens, M., Schmidt, K., Ozkul, A., & Groschup, M. H. (2013).** The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Research*, 98(2), 248-260. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.02.007
- Mertens, M., Schuster, I., Sas, M. A., Vatanserver, Z., Hubalek, Z., Güven, E., Deniz, A., Georgiev, G., Peshev, R., & Groschup, M. H. (2016).** Crimean-

- Congo hemorrhagic fever virus in Bulgaria and Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(9), 619-623. doi: 10.1089/vbz.2016.1944
- Mertens, M., Vatansever, Z., Mrenoshki, S., Krstevski, K., Stefanovska, J., Djadjovski, I., Cvetkovikj, I., Farkas, R., Schuster, I., Donnet, F., Comtet, L., Tordo, N., Ben Mechli, M., Balkema-Buschmann, A., Mitrov, D., & Groschup, M. H. (2015).** Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the former Yugoslav Republic of Macedonia revealed by screening of cattle sera using a novel enzyme-linked immunosorbent assay. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003519. doi: 10.1371/journal.pntd.0003519
- Orkun, Ö., Karaer, Z., Çakmak, A., & Nalbantoglu, S. (2017).** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: A broad range tick surveillance study. *Infection, Genetics and Evolution*, 52, 59-66. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.017
- Özüpak, T. (2017).** *Kırım kongo kanamalı ateşi virüsünün kene ve evcil ruminant (sığır, koyun ve keçi) kan ve sütlerinde varlığının araştırılması / The investigation of presence of crimean-congo hemorrhagic fever virüs (cchfv) in tick and blood and milk of domestic ruminant species (cattle, sheep and goat)*. (Publication No. 468749) [PhD Thesis, Samsun 19 Mayıs University]. Thesis Center of Turkish Council of Higher Education.
- Rencher, A. C. (2002).** *Multivariate Analysis of Variance*. USA: John Wiley & Sons.
- Rokach, L., & Maimon, O. (2008).** *Data mining with decision trees theory and applications*. Singapore: World Scientific.
- Schuster, I., Mertens, M., Mrenoshki, S., Staubach, C., Mertens, C., Brüning, F., Wernike, K., Hechinger, S., Berxholi, K., Mitrov, D., & Groschup, M. H. (2016).** Sheep and goats as indicator animals for circulation of CCHFV in the environment. *Experimental and Applied Acarology*, 68(3), 337-346. doi: 10.1007/s10493-015-9996-y
- Şevik, M. (2018).** Epidemiological Investigation of CrimeanCongo Hemorrhagic Fever infection in Cattle in some provinces of Turkey. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 29(1), 24-29.
- Tonbak, S., Aktas, M., Altay, K., Azkur, A. K., Kalkan, A., Bolat, Y., Dumanli, N., & Ozdarendeli, A. (2006).** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4120-4124. doi: 10.1128/JCM.00644-06
- Tuncer, P., Yesilbag, K., Alpay, G., Dincer, E., Girisgin, A. O., Aydın, L., Uyar, Y., & Ozkul, A. (2014).** Crimean-Congo hemorrhagic fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61, 49-53. doi: 10.1501/Vetfak_0000002604
- World Health Organization (2013).** *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever>
- Vatansever, Z. R., Uzun, A., Estrada-Pena, O., Ergonul (2007).** *Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey*. In *Crimean- Congo Hemorrhagic Fever*, eds. O. Ergonul and C. Whitehouse, 155-165. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Yilmaz, G. R., Buzgan, T., Irmak, H., Safran, A., Uzun, R., Cevik, M. A., & Torunoglu, M. A. (2009).** The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 380-386. doi: 10.1016/j.ijid.2008.07.021

The effect of organochlorine insecticides on honey bee

(*Apis mellifera*) deaths seen in Adana region

ABSTRACT

Our society has attached great importance to beekeeping and honey since the past, and the popularity of other bee products in recent years has made beekeeping and bee health even more important. There are many reasons that can cause colony loss, which is seen together with intense deaths in bees, one of them is death due to toxicity caused by pesticides. In the study, 188 bee samples received between January and April 2015-2018 in Adana region were examined. These samples were examined qualitatively in terms of organochlorine pesticides by scanning the pesticides with gas chromatography device and scanning analysis method with GC-MS technique in materials with suspected poisoning. In the examination of the bee samples, there was no detectable level of any substance in terms of organochlorine pesticides. This situation showed that organochlorine pesticides did not play a role in bee colony losses in the samples received in Adana province and its surroundings between 2015-2018 due to the suspicion of toxicity due to heavy bee deaths. It should be kept in mind that deaths with massive bee colony losses may be due to different pesticide types and / or subacute and acute diseases.

Keywords: *Apis mellifera*, honey bee, organochlorine, insecticide, poisoning

INTRODUCTION

Pesticides are used to protect economically from the negative effects of diseases, pests and weeds, which are a problem in agricultural production in our country as well as all over the world (Durmuşoğlu et al., 2010). Pesticides, living or found on or around human and animal bodies, plants and inanimate objects; and also, substances used to kill pests that reduce or damage their nutritional value during the production, preparation, storage and consumption of nutrients (Kaya and Bilgili, 1998). Pesticides are toxic chemicals with a specific mechanism of action; that is, they are designed to specifically control a target group of organisms by interfering with certain metabolic pathways (Sanchez-Bayo and Gako, 2016). Pesticides pose a danger to humans and animals, including wildlife, as they carry the risk of acute, subacute and chronic poisoning and mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects. And also, they can cause food and environmental pollution. (Daş ve Kaya, 2004). Pesticides can be classified in various ways according to their mode of action, rate of action, chemical structure, types of parasites they affect, formulations and toxicity (Kaya and Bilgili, 1998). Pesticides are named according to the organism they affect and the pesticide function; insecticide (against insects and pests), fungicide (against fungi), herbicide (against weeds), molluscicide (against mollusks), rodenticide (against rodents), nematicide (against nematodes), acaricide (against mites).

How to cite this article

Seğmenoğlu, MS. (2021). The effect of organochlorine insecticides on honey bee (*Apis mellifera*) deaths seen in Adana region. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 239-242. <https://doi.org/10.31797/vetbio.947244>

Research Article

Mansur Seymen Seğmenoğlu

¹Department of Nursing,
Faculty of Health Sciences,
Osmaniye Korkut Ata
University, Osmaniye,
Turkey

ORCID-

[0000-0003-2743-6245](https://orcid.org/0000-0003-2743-6245)

Correspondence

Mansur Seymen

SEĞMENOĞLU

mansurseymen@gmail.com

Article info

Submission: 03-06-2021

Accepted: 28-11-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0

International License



Classification of pesticides by their chemical structure is the most common and useful method of pesticide classification. Insecticides are also divided into various subgroups such as organochlorines (OC), organophosphorus (OF), pyrethroids, carbamates, neonicotinoids, spinosyns (Akashe et al. 2018). Pesticides contaminate non-target areas of blooming plants, wildflowers, beehives, pollen and nectar, so bees can be exposed to insecticides that are harmful to them. In cases where exposure is suspected, it is necessary to examine dead bee samples and identify the cause of death and possible pesticides (Lozowicka, 2013).

In this study, our aim is to investigate whether organic chlorine insecticides have an effect on intense bee deaths between January and April, which is the wintering period in Adana region.

MATERIAL and METHOD

Due to the intense bee deaths that occurred between January and April in the Adana region, a total of 188 jar bee samples sent to Adana Veterinary Control Institute and collected from the field by experts were examined for OC insecticide (89 jar in 2015, 10 jar in 2016, 57 jar in 2017, 32 jar in 2018). Each jar sample contains 100 g of newly dead bees or dying bees. Incoming bee samples were analyzed within 3-4 days and kept in the refrigerator at $\pm 4^{\circ}\text{C}$ until analysis. "Scan analysis method of pesticides with GC-MS technique in suspected poisoning materials" was used as the analysis method (GTHB, 2013). Scanning was performed with gas chromatography (GC) device and detectors connected to the device (Agilent 5975C Series GC/MSD System with triple-axis detector; MSD: mass spectrophotometer detector, ECD: electron capture detector, D-FPD: flame photometric detector x2).

According to the working method, each bee sample was thoroughly shredded in the shredder

in the extraction of the samples, and then the disintegrated sample was weighed as 25 g in the erlenmeyer, and then 75 ml of acetonitrile was added to it, and then mixed in the mixer and left for 4 hours. After 4 hours, it was filtered into a separatory funnel using filter paper and a funnel. 125 ml of 2% saline and 50 ml of n-hexane were added to the filtrate, respectively, and waited until phase separation, and then the upper phase was passed through a funnel in which some powdered sodium sulfate was placed and taken into a 120 ml porcelain capsule, and then the lower phase was taken to a separate erlenmeyer, and then 50 ml of chloroform was added to the lower phase in erlenmeyer and it was taken back to the separating funnel and a phase difference was expected. Depending on the phase difference, the lower phase was passed through a funnel with powdered sodium sulfate and added to the same capsule, and then the liquid in the capsule was expected to evaporate in the fume hood. The dried extract in the capsule was dissolved by adding 2 ml of methanol, and then the liquid was passed at high pressure through a glass pasteur pipette providing filtration with powdered sodium sulfate, and then the filtered liquid was given to the GC device in a vial. Analysis was performed by injecting 2 μl of each sample into the GC device system. Device defined "pp'DDD, pp'DDE, op'DDT, pp'DDT, hexachlorobenzene, alpha/beta/gamma-hexachlorocyclohexane, alpha-endosulfan, beta-endosulfan, endosulfan sulfate, cis-chlordane, beta-chlordane, aldrin, dieldrin, diclofop-methyl, heptachlor, bromopropylate, tetradifon, acetochlor, phenoxoprop-P-ethyl" OC pesticides were analyzed and also other OC pesticides in the device library were examined.

RESULTS

Three detectors are connected to the GC device in the laboratory, and with these three detectors, the mass weight, electron and light intensity

measurement of the analyte, if present in the sample, are defined simultaneously. As seen in Table 1, no detectable residue was found in

terms of OC insecticides that could cause toxication in the examination of a total of 188 jar bee samples.

Table 1. The number of samples examined in terms of OC insecticide by years

Year	Pesticide Group	Number of Samples Analyzed	Positive Sample	Detected Analytes
2015	Organochlorine	89	None	No analyte
2016	Organochlorine	10	None	No analyte
2017	Organochlorine	57	None	No analyte
2018	Organochlorine	32	None	No analyte

OC analytes: pp'DDD, pp'DDE, op'DDT, pp'DDT, hexachlorobenzene, alpha/beta/gamma-hexachlorocyclohexane, alpha-endosulfan, beta-nedosulfan, endosulfan sulfate, cis-chlordane, beta-chlordane, aldrin, dieldrin, diclofop-methyl, heptachlor, bromopropylate, tetradifon, acetochlor, phenoxoprop-P-ethyl

DISCUSSION

Honey bees play an important role in the environmental ecosystem, as pollinating species with contribute to the production of honey, beeswax and other bee products (Panseri et al., 2020). The European or western honey bee, *Apis mellifera* L., is used for pollination in growing agricultural and horticultural plants and its contribution to agricultural production in the world is around 170-200 billion dollars (Cloyd, 2019). Pesticides are used to protect agricultural products, but some can affect bee health with their toxicity, depending on the active ingredient used and the formulation of different pesticide products (Lozowicka, 2013).

In a survey study conducted in the United States in the 2000s, one hundred and twenty-one different pesticides and metabolites were found in 887 samples, including beeswax, pollen, bee and hive samples. Among them are 6 OC insecticides. Only 16 samples could not detect pesticides (Johnson et al., 2010). Although it has been stated that the use of OC such as DDT and lindane has been prohibited in Poland for more than 10 years, Lozowicka (2013) found traces of these OC insecticides in bee samples in southeastern Poland. Since their detected concentrations were very low, these substances were not considered to be responsible for bee deaths, but these determinations revealed that the environment is

still polluted by these toxins (Lozowicka, 2013).

In 2019 and 2020, 98 honey samples were collected from hives in 4 different areas (dense orchards, agricultural land, areas close to the city without agriculture, and arable land with orchards) in the Apulia Region in southern Italy. Hexachlorobenzene (approximately 83% of samples), 4,4'-DDE (61% of samples) and Aldrin (19% of samples) insecticides were detected throughout the all-region. They also detected different OC insecticides in some, but not all, of the field (Panseri et al., 2020).

OC insecticides were not found in our study between 2015-2018, however, Johnson et al. (2010), Lozowicka (2013), and Panseri et al. (2020) as seen in the articles of, OC insecticides are always widely used in agriculture in the world and it is seen that this situation affects bee products as well as bee health.

The risk of affecting bee health increases when legal requirements or good practices for pesticide application are not followed, among other potential factors (Lozowicka, 2013). Beekeeping and bee health activities in Turkey have been put on the agenda with the "Regulation on Beekeeping" (TKB, 2003). In Turkey, honey and other beekeeping products are protected from pesticides according to the

'Turkish Food Codex Regulation on Maximum Residue Limits of Pesticides'. The maximum residue limit (MRL) values for pesticides allowed for bees and other bee products are available in the table in Annex-5 of this regulation. For pesticides not included in Annex-5, an evaluation is made on the basis of 0.01 mg/kg as MRL (GTHB, 2016).

CONCLUSION

In the Adana region, there were intense bee deaths in the 2015-2018 periods, but it was determined that there were no deaths caused by OC insecticides in line with the analyzes made. It should be noted that while poisoning and death may be caused by different insecticide groups, bee deaths may also be caused by subacute and/or acute infectious diseases, sudden weather changes and other environmental factors.

To prevent possible poisoning; pesticides with low toxicity should be preferred, the beekeeper should be notified a few days in advance of the application of pesticides, the beekeeper should also take into account the warnings, pesticides should be applied in the afternoon or in the evening, dosage adjustment of the drugs used should be done according to the prospectus/instructions for use, pesticides should not be combined with different substances other than the leaflet information.

ACKNOWLEDGMENT

The abstract of the article was presented orally at the 2nd International Mardin Artuklu Scientific Research Congress held in Mardin on 23-25 August 2019 and was included in the summary book.

Ethical approval: This study data was used with the permission of Adana Veterinary Control Institute Directorate dated 14.05.2019 and numbered E.1527852.

KAYNAKLAR

- Akashé, M.M., Pawade, U.V., Nikam, A.V. (2018).** Classification of Pesticides: A Review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*, 9 (4).
- Cloyd, R.A. (2019).** Effects of Pesticides and Adjuvants on the Honey Bee, *Apis mellifera*: An Updated Bibliographic Review. *Modern Beekeeping*. doi: 10.5772/intechopen.89082.
- Daş, Y.K., Kaya, S. (2004).** The Research of Some Synthetic Pyrethroids Insecticide Residues in Honey Produced in Turkey. *Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 15, 1-2.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., Canhilal, R. (2010).** Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 589-607.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB), (2013).** Zehirlenme Şüpheli Metaryallerde Pestisitlerin GC-MS Tekniğiyle Tarama Analiz Metodu, *Teşhiste Metot Birliği, Farmakoloji ve Toksikoloji*, 6, 100-103.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB), (2016).** Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği, *Resmi Gazete*, 25 Kasım 2016, sayı: 29899.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M. (2010).** Pesticides and Honey Bee Toxicity-USA, *Apidologie*, 41(3), 312-331.
- Kaya, S., Bilgili, A. (1998).** Pestisidler. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi*, 35(1): 211-339. ISBN: 975-7774-32-4.
- Lozowicka, B. (2013).** The Development, Validation And Application of a GC-Dual Detector (NPD-ECD) Multi-Pesticide Residue Method for Monitoring Bee Poisoning Incidents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 210-222.
- Panseri, S., Bonerba, E., Nobile, M., Cesare, F.D., Mosconi, G., Cecati, F., Arioli, F., Tantillo, G., Chiesa, L. (2020).** Pesticides and Environmental Contaminants in Organic Honeys According to Their Different Productive Areas toward Food Safety Protection. *Foods*, 9, 1863.
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K. (2016).** Impacts of Pesticides on Honey Bees, Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research, Chapter 4, *InTech Open Science*.
- Tarım ve Köyişleri Bakanlığı (TKB), (2003).** Arıcılık Yönetmeliği, *T.C. Resmi Gazete*, 25 Mayıs 2003, sayı: 25118.

Evaluation of the antioxidant potential of the mad honey collected from the black sea region in Turkey

Research Article

Efe Kurtdede^{1a}
Berk Baran^{2b}

ABSTRACT

Objective: Mad honey (*Rhododendron honey*) is produced by honeybees from *Rhododendron* flowers and contains grayanotoxins, antioxidants, flavonoid and phenolic properties. The mad honey samples are collected from Turkey's Black Sea region by local residents and are sold as mad honey in free-market conditions. This study was planned to evaluate the total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity and protein profiles with SDS-Page electrophoresis determined the mad honey samples collected from seven different locations from Black Sea region by local residents. **Material and Method:** Total phenolic content was determined by the modified Folin-Ciocalteu method. Total flavonoid content was determined by colorimetric method using aluminium chloride (AlCl₃). Total antioxidant activity was calculated according to the free radical scavenging effect of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Protein profiles evaluated with SDS-Page electrophoresis. **Results and Conclusions:** In Turkey, in the Black Sea Region, antioxidant potential of the honey samples known as mad honey, collected from seven different locations by local people, were evaluated. The mean total phenolic contents of the mad honey samples were found as 285,44±118,43 (125.85 to 471.18) mg GAE/kg honey, the mean total antioxidant activities were found as 29,68±7,2 (21.71 to 35.03) mg AAE/kg honey and the mean total flavonoid contents were found as 27,26±4,79 (19.93 to 39.18) mg QE/kg honey. The results revealed that the mad honey samples examined in this study were a good source of antioxidant, flavonoid and phenolic content at varying levels depending on the characteristics of the region where they were collected.

Keywords: Mad Honey, total flavonoid, total phenol, total antioxidant, protein profile

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey
² Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

ORCID-

^a[0000-0001-8436-3332](https://orcid.org/0000-0001-8436-3332)

^b[0000-0002-0461-8006](https://orcid.org/0000-0002-0461-8006)

Correspondence

Efe KURTDEDE

efekurtdede@gmail.com

Article info

Submission: 02-07-2021

Accepted: 01-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

[io](https://doi.org/10.31797/vetbio)

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



INTRODUCTION

Honey has been used in medicine since ancient times. The composition of honey is closely related to the differences in environmental factors, the variety of flowers from which honey is produced, and the environmental and climatic conditions of the region where honey is collected. Honey obtained from plants of the *Rhododendron* flowers is known as "mad honey". Flowers of the *Rhododendron* species are commonly found in Spain, Portugal, Japan, Brazil, the United States, Nepal, England, and Turkey. 'Mad honey' is common in the Black Sea region of Turkey. Especially Hopa, Kastamonu, Zonguldak, Rize, Ordu, Tokat and Sinop are the provinces where grayanotoxin-containing honey is detected. It is stated that consuming 50-100 g of mad honey at once may cause intoxication. Intoxication symptoms may occur within 20 minutes to 24 hours after consumption of mad honey. The main symptoms that can be seen in mad honey intoxication, depending on the amount of honey taken, are diarrhea, sweating, dizziness, temporary loss of consciousness, syncope, ECG disorders, blurred vision, hypotension and bradycardia.

How to cite this article

Kurtdede, E., Baran B. (2021). Evaluation of the antioxidant potential of the mad honey collected from the black sea region in Turkey. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 243-250. <https://doi.org/10.31797/vetbio.960851>

In patients with bradycardia and severe hypotension, atropine sulfate and intravenous saline infusion are administered as an early treatment (Salici and Atayoğlu 2015; Demir et al., 2011; Sayın et al., 2012). In the event that a complete atrioventricular blockade develops, a temporary pacemaker is applied in patients. Except for the case from Lanping County (Southwest China), the prognosis for mad honey poisoning is reported to be very good. Except for a few cases identified in the 1800s, it is stated that death from mad honey intoxication is rare in the modern medical literature today. Although the mortality rate is low, it is stated that mad honey consumption can cause arrhythmias that are life-threatening and difficult to differentiate (Shrestha et al., 2015; Dubey et al., 2009; Zhang et al., 2017; Ullah et al., 2018).

In addition, the bioactivity and antioxidant effects of each honey type are different from each other. As an alternative medicine Rhododendron honey consumption against various diseases has become very popular in recent years. It is stated that this honey has an antioxidant property that has been shown to be beneficial in the defense of cells with degeneration, despite the risk of toxic effects (Salici and Atayoğlu 2015; Demir et al., 2011). Mad honey is used as an alternative treatment method for various diseases among people, unlike the normal honey consumed for breakfast. For this purpose, it is used as an alternative medicine in cases of hypertension, diabetes, influenza infection, gastrointestinal disorders, abdominal pain, arthritis, sexual dysfunction, viral infections, skin diseases, pain and heat stress (Zhang et al., 2017; Lue and Wood 2000; Bobiş et al., 2018). In addition, it is well known that Rhododendron plant species have antiradical bioactivities such as antidiabetic, anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, antimicrobial, cytotoxic and insecticidal (Erejuwa et al., 2014; Zhang et al., 2017).

The composition of honey varies according to the type of flowers from which honey is obtained and the environmental conditions of the region where they are grown. It is generally accepted that there are more than 180 contents in the composition of honey. The main ingredients that give honey its sweetness are fructose (38%) and glucose (31%). In addition to disaccharides and trisaccharides are also found in honey in varying proportions. Include sucrose, maltose, trehalose, erlose, maltotriose, masculine, hybridose, centose 3-a5, isomaltosylglucose, 1-kestose, isomaltotriose, panose, isopanose, and teanderose (Rahman 2013; Bonta et al., 2008). Apart from carbohydrates, honey also contains enzymes, amino acids, proteins (0.1%-3.3%), flavonoids and phenolic acids. There are 26 amino acids reported in honey; among them, proline is the main additive, accounting for 50-85% of the total amino acids (Hermosin et al., 2003). Some of the flavonoids and phenolic contents identified in honey are kaempferol, quercetin, chrysin, pinobanksin, luteolin, apigenin, pinocembrin, genistein, hesperetin, p-coumaric acid, naringenin, gallic acid, ferulic acid, ellagic acid, syringic acid and caffeic acid, vanyl (Erejuwa et al., 2014; Ahmed and Othman 2013; Bobiş et al., 2021). There may also be toxic contents in honey that can be harmful to human health when consumed in excess of certain amounts, originating from nectars containing grayanotoxins collected from the flowers of plants such as *Rhododendron ponticum* or *Azalea pontica*, and causing the collected honey to be called "Mad Honey" (Jansen et al., 2012). Other toxic contents most frequently encountered in honey are hyoscyamine from *Datura* sp. (Miraldi et al., 2001), hyoscine from *Hyoscamus niger* (Jaremicz et al. 2014), saponin from *Serjania lethalis* (Ekabo et al., 1996) and strychnine from *Gelsemium sempervirens* (Zhang et al., 2013).

A large number of phenolic contents in the content of mad honey perform their antioxidant effects by defending the cells against the attacks

of free radicals, and by preventing some metabolic effect processes that these may cause. In this way, the balance between oxidants and antioxidants in a healthy condition of body are well maintained. However, this balance can disrupt due to oxidative stress caused by oxidants, free radicals. Biopolymers, including nucleic acids, proteins, carbohydrates, and polyunsaturated fatty acids are the main target for oxidants. Also, antioxidants can effectively protect cells against such damage. Therefore, they are vital for the homeostasis of cells and tissues (Buratti et al., 2007; Alzahrani et al., 2012; Tezcan et al., 2011; Narimane et al., 2017).

Evaluation of the total phenolic content, total flavonoid levels, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenging test results are the most preferred methods in demonstrating the antioxidant property of a content.

The antioxidant properties of mad honey and *Rhododendron ponticum* extracts have been evaluated in many studies in vivo and in vitro. Ersan et al., (2018) determined the grayanotoxin I and III levels of the mad honey samples they collected, and experimentally administered these honey samples to rats at a single dose of 12.5 mg/kg (acute), at a dose of 7.5 mg/kg for 21 days (subacute) and at a dose of 5 mg./kg dose for 60 days (chronic). As a result of their studies, they stated that acute, subacute and long-term use of mad honey may cause significant changes in oxidative stress markers and enzyme levels, and mad honey may have genotoxic results in rats. They stated that careless use of mad honey can cause significant side effects. Sahin et al., (2018) state that the effectiveness of mad honey is significantly higher than normal honey and propolis in the healing model of wounds and fractures they have experimentally created in rats. Bilir et al., (2018) concluded that *Rhododendron ponticum* extracts were effective on Du145 and PC3 prostate cancer cells in vivo.

In this study, mad honey samples collected from seven different locations in the Black Sea region of Turkey will be physically examined first, and then in order to evaluate the antioxidant properties of these honey samples, the antioxidant capacities of the honeys will be determined by determining the total phenolic and total flavonoid contents levels, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil. (DPPH) will be evaluated by applying radical scavenging tests. Despite the potential risk of toxic effects, mad honey is evaluated as a potential curative agent in clinical trials due to its high bioactivity. It is thought that the studies to be carried out on this subject will contribute to the diversification of the usage areas of mad honey collected from the Black Sea region, and will contribute to the up-to-date demonstration of the antioxidant properties of mad honey. The results to be obtained from this study will guide the analyzes to be made in this area.

MATERIAL and METHOD

Mad honey samples collected from seven different locations in the Black Sea region of Turkey were brought in dark plastic containers. Collected honey samples were stored at -40°C until analysis. In order to evaluate the total antioxidant activity of honey samples, honey samples were taken out of the deep freezer before the measurements of total phenolic content and total flavonoid content levels of honey samples and they were kept in an environment at room temperature for the samples to melt. Honey samples that melted and reached room temperature were diluted 1/3 with deionized water. In order for the dilution to be homogeneous, a vortex device was used for mixing. Afterwards, honey samples diluted in a homogenized manner were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes and made ready for chemical analysis.

In order to determine the protein profiles of mad honey samples, honey samples were first diluted using equal volumes of distilled water.

Acetone precipitation method was used to determine the protein levels of honey samples. For this purpose, one volume of honey was taken in a centrifuge tube and mixed with 4 mL of ice-cold acetone. The mixture was vortexed thoroughly and incubated in -20 °C deep freezer for 2 h. Then the tubes were centrifuged at 8,000 rpm at 4 °C for 10 min. The pellet obtained was air dried for 30 min and re-solubilised in 0.2 M phosphate buffer and kept at 4 °C (Bocian et al. 2019).

Protein quantification

The protein concentration of all the samples after precipitation was determined according to the method of Lowry et. al., (1951). BSA was used as the standard and the absorbance was read at 620 nm in a UV/VIS spectrophotometer.

SDS-Page

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was preformed according to the method of Laemmli (1970). Honey proteins were resolved on 12% separation gel with 5% stacking gel. When the bromophenol blue in the loading sample reached the lower end of the gel, it was removed and transferred to staining tray with Coomassie brilliant blue. The gel was kept in the staining tray overnight. The stained gel was determined for about 1-2 h and the process was repeated until the bands in the gel were clear, photographed and analyzed in a transilluminator.

Total Antioxidant

In order to calculate the total antioxidant activity of mad honey samples, the indirect method was used in the prepared extracts and in this way, the free radical scavenging effects of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were determined in honey samples. For this, extracts were prepared in 0.1 mM DPPH methanol and 1 mL and 3 mL of methanol-mixed extract were added to the measuring tubes. Measurements were performed in a spectrophotometer modified at 520 nm, using ascorbic acid as a reference, according to

the method of Meda et al., (2005) and Dimins et al., (2010).

The antioxidant activity of mad honey samples was expressed as the percent inhibition of DPPH and the calculation was carried out with the formula given below.

$$AA[\%] = (\text{Abs cont}-\text{Abs sample})/\text{Abs cont} \times 100.$$

Total Phenolic Content Concentration

The levels of total phenolic content concentrations were measured using the Folin-Ciocalteu method modified by Beretta et al. (2005). For this, 900 µl of distilled water was added to 100 µl of extract and 5 ml of Folin-Ciocalteu reagent solution was added on it, 4 ml of Na₂CO₃ (75 g/L) was added to this mixture after 4 minutes, and this final mixture was left to incubate for 2 hours. At the end of the incubation period, the activity was determined by reading the mixture at 750 nm in the spectrophotometer. The total amount of phenol in mad honey samples was calculated as equivalent to mg gallic acid in 100 g extract (Bertoncelj et al. 2007 Beretta et al. 2005, Diminis et al. 2010).

Total Flavonoid Concentration

The levels of total flavanoid content concentrations of mad honey samples were determined by Dewanto et al. (2002), using aluminum chloride, was evaluated colorimetrically. For this, 1.25 ml distilled water, 75 µl 5% NaNO₃ and 150 µl 10% AlCl₃ were added to 250 µl of mad honey sample. This mixture was allowed to incubate for 2 hours. At the end of the incubation period, the activity level was determined by reading the mixture at 765 nm in the spectrophotometer.

Statistical Analysis of Data

The assays were carried out in triplicate, and the results were expressed as mean values and the

standard deviation (SD) using Microsoft office Excel 2007. For statistical assessment of SDS Page electrophoresis bands prior to testing statistical significance all data were tested with Kurskal Wallis by using SPSS 12 statistical programme.

RESULTS

The mean total phenolic content (mg GAE/kg), total flavonoid content (mg QE/kg) levels and Total Antioxidant (mg AAE/1 g honey) values determined in mad honey samples are shown in Table 1.

In table1 results of the honey samples and that samples the mean total phenolic content level of

mad honey samples was 285.44 ± 118.43 (125.85-471.18) mg GAE/kg honey; the mean total antioxidant activity was 29.68 ± 7.2 (21.71-35.03) mg AAE/kg honey; and the mean total flavonoid content level was 27.26 ± 4.79 (19.93 - 39.18).mg QE/kg honey

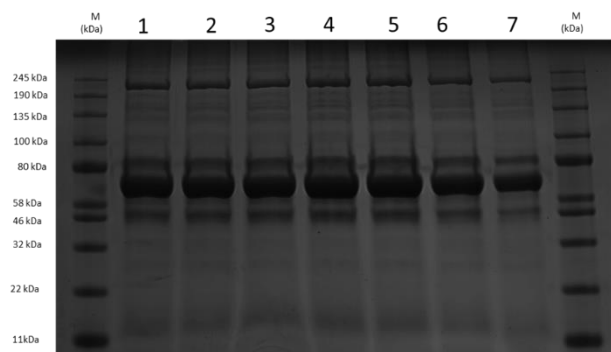


Figure 1. Mad Honey samples protein profile evaluation with SDS-PAGE electrophoresis

Table1. The mean total phenolic content (mg GAE/kg), total flavonoid content (mg QE/kg) levels and Total Antioxidant (mg AAE/1 g honey) values determined in mad honey samples (n=7).

Sample No	Total Phenolic Content (mg GAE/kg) $X \pm Sx$	Total Flavonoid Content (mg QE/ kg) $X \pm Sx$	Total Antioxidant level (mg AAE/1 g honey) $X \pm Sx$
1	125,85±8,20	28,26±4,76	21,64±4,93
2	242,48±23,36	29,95±4,77	36,7±1,78
3	415,6±2,12	26,15±4,06	35,04±6,50
4	256,82±14,58	21,28±5,42	34,92±3,81
5	220,84±11,12	21,71±5,13	21,71±6,79
6	265,28±3,17	35,03±4,91	35,03±2,59
7	471,18±5,67	28,47±3,48	22,71±7,20

DISCUSSION

The Oxidants and antioxidants levels are well balanced in organism. However, this balance can change due to oxidative stress caused by free radicals, which are destructive for cellular components nucleic acids, proteins, carbohydrates and fatty acids. Antioxidants can effectively protect cells against such damage with radical scavenging activity. Therefore, they are important parts for the homeostasis of cells and tissues. Most of the phenolic compounds in the content of mad honey show antioxidant properties by defending the cells against the attacks of free radicals and

preventing the progression of metabolic effect processes. (Buratti et al., 2007; Alzahrani et al., 2012; Tezcan et al., 2011; Narimane et al., 2017).

The antioxidant properties of mad honey and *Rhododendron ponticum* extracts have been evaluated in many in vivo and in vitro studies. Ersan et al., (2018) determined grayanotoxin I and III levels in mad honey and administered these honeys to rats for 12.5 mg/kg single dose (acute), 7.5 mg/kg 21 days (subacute) and 5 mg/kg 60 days (chronic) periods. As a result of their studies, they stated that acute, subacute and chronic use of mad honey has significant effects on oxidative stress markers and enzyme levels and may lead to genotoxic results. They stated that careless use for medical purposes may cause significant side effects. Sahin et al., (2018)

determined that the positive effect of mad honey on the healing model of wounds and fractures they created experimentally in rats was significantly higher than that of normal honey and propolis. Bilir et al., (2018) concluded that *Rhododendron ponticum* extracts were effective on Du145 and PC3 prostate cancer cells.

In various studies, the total phenolic contents in mad honey samples were 0.160-0.606 mg Gallic acid equivalents (GAE)/g (Sahin et al., 2015), 215.43-846.22 mg Gallic acid equivalents (GAE)/kg (Koca et al., 2015), 0.24-141.83 mg GAE /100 g (Silici et al., 2010). Lachman et al., (2010) reported that the total phenolic substance levels in 40 honey samples varied between 0.216-0.900 mg GAE/g. In our study, the average total phenolic content level in mad honey samples collected from 7 different locations of the Black Sea region was measured as 285.44±118.43 (125.85 to 471.18) mg GAE/kg honey (Table 1) and this result was found to be consistent with the above values. Ozkok et al., (2010) reported that they found the total phenolic content of pine honey as 35.36-365.94 mg GAE/kg in their study. The mean total antioxidant activity of 7 mad honey samples in our study was 29.68±7.2 (21.71 to 35.03) mg ascorbic acid equivalent (AAE)/kg honey (Table 1). This result was consistent with Silici et al., (2010) detected antioxidant activities in mad honey (12.76-80.80 mg ascorbic acid equivalent /g) levels. Ozkok et al., (2010) determined the total flavonoid level in pine honey as 4,80-22.80 mg QE/kg. The mean total flavonoid content in mad honey samples in our study was determined as 27.26±4.79 (19.93 to 39.18) mg Quercetin equivalents QE/kg honey (Table 1). Total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant activity levels determined in 7 mad honey samples used in our study were found to be compatible with the data reported by various researchers above.

Despite the reports in various studies that the properties of proteins in honey samples collected

from various regions vary according to the type of plant flora and environmental factors, as a result of the evaluation of SDS-Page electrophoresis bands in mad honey samples in our study; It was revealed that there was no significant difference between the bands in mad honey samples taken from 7 different regions. In addition, it was concluded that the changes in the levels of total phenolic content, total antioxidant content and total flavonoid content in mad honey samples in this study did not cause any change in the protein levels of honey samples, which was similar to the results of other studies on this subject (Nath et al., 2018; Bocian et al. 2019).

CONCLUSION

In this study, mad honey samples collected from 7 different regions of the Black Sea region were primarily evaluated physically. Then, the total phenolic substance, total antioxidant activity, and total flavonoid content and protein profiles of these mad honey samples were revealed. In this way, it was aimed to enable the diversification of the usage areas of mad honey produced in the Black Sea region. Despite its toxic effect potential, noticeable antioxidants activity, rich in phenolics and flavonoid content in mad honey has been evaluated as a potential substance for clinical trials that may be useful in the field of alternative medicine due to its high bioactivity.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Prof. Dr. Ertuğrul KAYA for their contribution to the obtain of samples.

This study was supported by TUBİTAK 2209A Student Scientific Research Grant (grant no. 1919B011903298).

This article published in the 6th International Congress on Advances of Veterinary Sciences and Techniques (ICAVST) On August 23-27, 2021 in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Ethical approval: This study does not present any ethical concerns

Conflict of interest: The authors declared that there is no conflict of interest

KAYNAKLAR

- Ahmed, S., Othman N. H. (2013).** Review of the medicinal effects of tualang honey and a comparison with manuka honey. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 20(3), 6-13.
- Alzahrani, H. A., Boukraa, L., Bellik, Y., Abdallah, F., Bakhotmah, B. A., Kolayli, S., Sahin, H. (2012).** Evaluation of the Antioxidant Activity of Three Varieties of Honey from Different Botanical and Geographical Origins. *Global Journal of Health Science*, 4(6), 192-196.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. 2005.** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-91.
- Bertoncelj, J., Dobersek U, Jamnik M, Golob T. (2007).** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-8.
- Bilir, E. K., Tutun, H., Sevin, S., Kismali, G., Yarsan, E. (2018).** Cytotoxic Effects of Rhododendron ponticum L. Extract on Prostate Carcinoma and Adenocarcinoma Cell Line (DU145, PC3). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(3), 451-457. DOI: 10.9775/kvfd.2017.19219.
- Bobış, O., Dezmirean, D., Moise, A.R. (2018).** Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 12. doi.org/10.1155/2018/4757893.
- Bobış, O., Bonta, V., Cornea-Cipcigan, M., Nayik, G.A., Dezmirean, D.S. (2021).** Bioactive Molecules for Discriminating Robinia and Helianthus Honey: High-Performance Liquid Chromatography–Electron Spray Ionization–Mass Spectrometry Polyphenolic Profile and Physicochemical Determinations. *Molecules*, 26(15), 4433.
- Bonta, V., Marghitas, L.A., Stanciu, O., Laslo, L., Dezmtean, D., Bobış, O. (2008).** High-performance liquid chromatographic analysis of sugars in Transilvanian honeydew honey, *Bulletin USAMV-CN*, 65(1-2), 229-232, ISSN 1843-5262
- Buratti, S., Benedetti, S., Cosio, M. S. (2007).** Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 71(3), 1387-92. doi: 10.1016/j.talanta.2006.07.006.
- Demir, H. A., Denizbasi, A., Onur O. (2011).** Mad honey intoxication: A case series of 21 patients. *ISRN Toxicology*, 11 (3).
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Liu, R. H. (2002).** “Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50, 3010-14.
- Dimins, F., Kuka, P., Augspole. I. (2010).** Characterisation of honey antioxidative properties. International Conference of Food Innova, 28-9.
- Doğan, M. (2007).** Marketlerde ve Attarlarda Satılan Balların Antioksidan ve Oksidan Kapasitelerinin Araştırılması. (Publication No. 195864) [Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Şanlıurfa]. Yök Tez Merkezi
- Dubey, L., Maskey, A. Regmi, S. (2009).** Bradycardia and severe Hypotension caused by wild honey poisoning. *Hellenic Journal of Cardiology*, 50, 426 - 428.
- Ekabo, O. A., Farnsworth, N. R., Henderson, T. O., Mao, G., Mukherjee, R. (1996).** Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *Journal of Natural Products*, 59, 431-435.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A., (2014).** Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*, 19(2), 2497-2522.
- Ersan, G., Kanbur, M., Karabacak, M., Arslan, K., Siliğ, Y., Sarica, S. Z., Tekeli, M. Y., Taş, A. (2018).** “Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 37(9), 991-1004.
- Hermosín, I., Chicón, R. M., Cabezudo, M. D. (2003).** Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263-268.
- Jansen, S. A., Kleerekooper, I., Hofman, Z. L., Kappen, I. F., Stary-Weinzinger, A., van der Heyden, M. A. (2012).** Grayanotoxin poisoning: ‘mad honey disease’ and beyond. *Cardiovascular Toxicology*, 12, 208-215.
- Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A., Krolicka, A., Sowinski, P. (2014).** Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnology Letters*, 36, 843-853.
- Lue, T. F., Wood, A. (2000).** Erectile dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1802 -1812.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G. (2005).** Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-7.
- Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., Comparini, I. B. (2001).** Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*. 72, 644-648.
- Narimane, S., Demircan, E., Akkal, S., Rhouati, S. (2017).** Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4), 1417-1423.
- Rahman, K. (2013).** Phytochemical analysis and chemical composition of different branded and unbranded honey samples. *International Journal of Microbiological Research*, 4(2), 132-137.
- Sahin, A., Türkmen, S., Güzel, N., Mentese, A., Turedi, S., Karahan, S.C., Yulug, E., Demir, S., Aynaci, O., Deger, O., Gunduz, A. (2018).** A Comparison of the Effects of Grayanotoxin-Containing Honey (Mad Honey), Normal Honey, and Propolis on Fracture Healing. *Medical Principles and Practice*, 27, 99-106.

- Salici, S., Atayoglu A. T. (2015).** Mad honey intoxication: A systematic review on the 1199 cases. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 282-290.
- Sayin, M. R., Karabag, T., Dogan, S. M., Akpınar, I., Aydin, M. (2012).** Transient ST Segment elevation and left bundle branch block caused by mad-honey poisoning. *Wiener klinische Wochenschrift*, 124, 278 - 281
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., Li, P. (2010).** Antioxidant activity in vitro of selenium-contained protein from the se-enriched. *Bifodobacterium animalis*. *Anaerobe*, 16, 380-386.
- Shrestha, B., Paudel, P. A. (2015).** Case report on mad (wild) honey intoxication. *Journal of Chitwan Medical College*, 5, 40-41.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E. (1990).** Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1565-1571.
- Tezcan, F., Kolayli, S., Sahin, H., Ulusoy, E., Erim, F. B. (2011).** Evaluation of Organic Acid, Carbohydrate Composition, and Antioxidant Properties of Some Authentic Turkish Honeys. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50, 33-40.
- Ullah, S., Khan, S.U., Saleh, T.A., Fahad, S. (2018).** Mad honey: uses, intoxicating/poisoning effects diagnosis, and treatment. *RSC Advances*, 8, 18635. DOI: 10.1039/c8ra01924j.
- Wilczyńska, A. (2010).** Phenolic content and antioxidant activity of different types of polish honey a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(4), 309-13.
- Zhang, J. Y., Gong, N., Huang, J. L., Guo, L. C., Wang, Y. X. (2013).** Gelsemine, a principal alkaloid from *Gelsemium sempervirens* Ait.; exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal $\alpha 3$ glycine receptors. *Pain*, 154, 2452-2462.
- Zhang, Q., Chen, X., Chen, S., Ye, Y., Luo, J., Li, J., Yu, S., Liu, H., Liu, Z. (2017).** Fatal honey poisoning in southwest china: a case series of 31 cases. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 48, 189 -196.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951).** Protein estimation by Lowry's method. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Hermosin, I., Chicon, R. M., Cabezudo, M. D. (2003).** Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. 83(2), 263-268.
- Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L. (2010).** Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*, 121(1), 238-243.
- Koca, I., Koca, A. F., Yılmaz, V. A., Tekgüler, B., Bostancı, S. (2015).** Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Mad Honey. XXXVI CIOSTA CIGR V Conference, St. Petersburg, Russia, May 26-28.
- Lachman, J., Orsak, M., Hejtmankova, A. (2010).** Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT- Food Science and Technology*, 43(1), 52-58.
- Özkök, A., D'arcy, B., Sorkun, K. (2010).** Total phenolic acid and total flavonoid content of Turkish pine honeydew honey. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 2(2), 65-71.
- Bocian A., Buczkowicz J., Jaromin M., Hus KK., Legath J. (2019).** An Effective Method of Isolating Honey Proteins. *Molecules*. 24(13), 2399.
- Nath, A. KGR, Nair, J. A., Sugunan, V. S. (2018).** Comparison of proteins in two honey samples from Apis and stingless bee. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(2), 09-11.

Plasma T₃ (Triiodothyronine) and T₄ (Thyroxine)

hormone levels as reference values in rehabilitated healthy gray herons (*Ardea cinerea*)

ABSTRACT

In the rehabilitation of wild birds, determining the release criteria is very important for the survival of the animal after its release to the nature. When determining these criteria, the clinical examinations and clinical data of the animals should be evaluated. Therefore, reference laboratory values play a vital role in determining release to nature. In this study, 15 (fifteen) adults and healthy Gray heron (*Ardea cinerea*) were brought to the 'Kafkas University, Wild Animal Protection, Rescue, Rehabilitation Application and Research Center' clinic in May 2016, because their nests were destroyed as a result of the overturning of the plane tree in Iğdır province, and they did not leave their surroundings, were rehabilitated. Birds were kept in bird care rooms specially designed for their species in the rehabilitation center. The birds were taken blood 4 days after being rehabilitated and then released into the nature. Plasma triiodothyronine (T₃) and thyroxine (T₄) hormone levels in birds were determined as a result of the analysis of blood samples. It was concluded that the differences in plasma T₃ and T₄ hormone levels obtained from a total of 15 birds were due to the increasing physiological and metabolic needs during the captivity period in center.

Keywords: Bird physiology, captivity, Gray Heron, rehabilitation, thyroid hormones

INTRODUCTION

Thyroid hormones; thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) are critical for neurodevelopment, development of somatic cells and gonads in young animals (fetus, newborn and juvenile) (Nakao et al., 2008; Sørmo et al., 2005). They also play a role in regulating metabolism, thermoregulation, reproduction, and maintaining physiological homeostasis (Cherel et al., 2004; Cooke et al., 2004; Davis et al., 2000; Decuyper et al., 2005; Hudelson and Hudelson, 2009; Scanes and McNabb, 2003). Recently, studies have been conducted to investigate the relationship between thyroid hormones and many issues such as environmental factors (such as temperature, light, heat, humidity), keeping animals in captivity, the effect of contaminants (Baos et al., 2006; Cherel et al., 2004; Decuyper et al., 2005; Schmidt and Reavill, 2008). Environmental changes in wild birds cause significant physiological changes (Scanes and McNabb, 2003; Walker et al., 2005). As a result of these changes, the animal uses its available resources mostly for survival. And this puts extra physiological burden on the animal (Bennett et al., 2011; Davis et al., 2000). Especially keeping them in unsuitable cages or rooms may cause increased metabolism and stress in birds especially in rehabilitation centers (Bennett et al., 2011; Everds et al., 2013).

How to cite this article

Sönmez E. (2021). Plasma T₃ (Triiodothyronine) and T₄ (Thyroxine) hormone levels as reference values in rehabilitated healthy gray herons (*Ardea cinerea*). *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 251-257. <https://doi.org/10.31797/vetbio.992819>

Research Article

Evrım Sönmez^{1a}

¹Department of Mathematics and Science Education, Science Teaching Faculty, Sinop University, Sinop

ORCID-

[*0000-0002-5412-5728](https://orcid.org/0000-0002-5412-5728)

Correspondence

Evrım SÖNMEZ

esonmez@sinop.edu.tr

Article info

Submission: 08-09-2021

Accepted: 03-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

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

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



In addition, basal metabolism and thyroid hormone metabolism may be affected in these centers by reasons such as odor, noise, light conditions, daily diet (Everds et al., 2013; Morgan and Tromborg, 2007). One of the aims of conservation biology is to understand the mechanisms of adaptation of wild animals to environmental conditions, what strategies they use, and the differences between individuals (Angelier et al., 2016).

In the rehabilitation of wild birds, it is important to determine when the bird will be considered healthy for release (Bennett et al., 2011). Therefore, in addition to clinical examination, the birds should also be evaluated hematologically, biochemically and physiologically (Guerra et al., 2018; Totzke et al. 1999). However, data on hormonal components in wild birds are very limited (Everds et al., 2013; Spagnolo et al., 2006). At the same time, since there are reference differences between species, intra-species comparisons can be one of the reliable parameters when assessing the health status of birds before release (Decuypere et al., 2005; Scanes and McNabb, 2003). Increased thyroid hormone levels in wild birds are thought to be more related to metabolic expenditures. In a study they conducted with *Rissa tridactyla* and *Uria lomviaher*, they investigated the relationship between basal metabolic rate, T₃ and T₄, and found that T₃ increased with basal metabolic rate in both species (Elliot et al., 2013). Chastel et al. (2003) similarly, in a study they conducted with *Passer domesticus*, found a directly proportional relationship between basal metabolism and T₃ hormone. Davis et al. (2000) in a study conducted with hens (Single Comb White Leghorn) kept in long-term cages, it was found that corticosteroid, T₃ and T₄ hormones change depending on egg production, and the hormone levels of hens with the highest egg production are also high.

In this study, no trauma or health problems were found in the physical examinations of Gray

herons brought to the rehabilitation center. In this study, it was tested whether the practices during rehabilitation stressed the Gray herons and their relationship with T₃ and T₄ metabolism. After the Gray herons were rehabilitated, it was aimed to contribute to the literature by determining the plasma levels of T₃ and T₄ hormones just before they were released into the nature. In addition, understanding the physiology, hormonal status and thyroid metabolism of wild birds may help us determine conservation strategies of wild birds in the future.

MATERIAL and METHOD

In this study, 15 (fifteen) adults and healthy Gray heron (*Ardea cinerea*) who were brought to the 'Kafkas University, Wild Animal Protection, Rescue, Rehabilitation Application and Research Center' clinic in May 2016, because their nests were destroyed as a result of the overturning of the plane tree in Iğdır province, and they did not leave their surroundings, were evaluated. The aim of the rehabilitation of wild birds is to treat animals and release them back to the nature. For this reason, the international standards followed by the rehabilitation centers have been complied with in order to prevent any different reasons that could stress the birds during their stay at the center. In this process, considering that the procedure they experience for blood samples may cause stress, these birds living in captivity were contacted with the same physicians for minimum stress conditions. There was no unnecessary physical contact during the process and it was manipulated by the same medical staff during the blood collection.

No trauma or health problems were found in the clinical examinations of the Gray herons. They were rehabilitated in a center with optimal environmental conditions and species-specific shelter and flight areas (5 m/6 m/30 m). They were not disturbed for any reason other than the investigators' routine visit and were fed on white

meat specific to the species. In order to prevent the birds from getting more stressed, no unnecessary medical intervention was made in the rehabilitation process. No blood samples were taken from these birds for hormonal examinations upon their first admission to the center. Therefore, there is no control group data showing the initial hormonal status of the birds in the study. Blood samples were taken 4 days after the birds were taken into the rehabilitation process, and all individuals were released back to the wildlife in suitable areas.

Collection of blood samples and analysis

As soon as the birds were brought to the center, they were taken to rehabilitation. After 4 days of rehabilitation, blood samples taken from ulnar / basilic venae and transferred to EDTA (BD vacutainer, K₂ EDTA) tubes were centrifuged at 3000 rpm (Electro-mag M815M) for 5 minutes

RESULTS

In this study, plasma T₃ hormones were found to be statistically different in only 2 individuals

and their serum was obtained. Serum samples obtained were stored at -20 °C (Profilo 6600) until analysis. Chicken T₄ (Thyroxine, MyBiosource) ELISA kit and Chicken T₃ (Triiodothyronine, MyBiosource) ELISA kit was used to analyze the T₃ and T₄ hormones of the samples. The analyses were carried out according to the Elisa kit booklet.

Statistical analyses of data

The data were analyzed with SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences). The normality test of the data was performed using the Shapiro-Wilk test, and it was found that the groups were not normally distributed separately ($p < 0.05$). Statistical analysis of blood samples taken from rehabilitated birds was performed by Chi-Square test and $p \leq 0.05$ was considered as significant.

and T₄ hormones in 6 individuals compared to the others (Figure 1 and 2).



Figure 1. Plasma T₃ hormone levels of rehabilitated healthy Gray herons. *Statistically different individuals. Mean: Fifteen Gray herons' average plasma T₃ level (Mean ± Standart Deviation: 2.49±1.67). $p = 0.011$. Chi-square: 27.267.

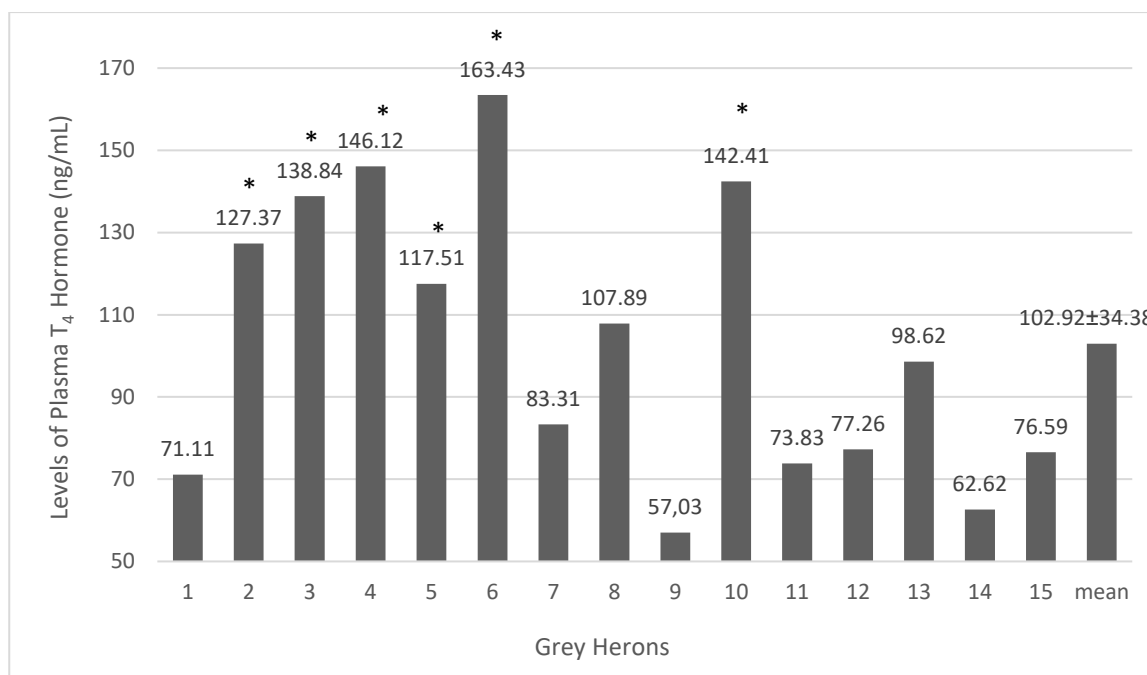


Figure 2. Plasma T₄ hormone levels of rehabilitated healthy Gray herons. *Statistically different individuals. Mean: Fifteen Gray herons' average plasma T₄ level (Mean ± Standart Deviation: 102.92±34.38). $p < 0.001$. Chi-square: 159.724.

DISCUSSION

The secretion of thyroid hormones is regulated by the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis (Decuyper et al., 2005; Everds et al., 2013; Helmreich et al., 2005). There are two active forms of thyroid hormone circulating in living things. T₃ is the biologically active form. Because it binds to thyroid hormone receptors with higher affinity than T₄. Peripheral tissues can convert T₄ to T₃ by the action of 5'-deiodinase (Harr, 2002; Hudelson and Hudelson, 2009; Kaneko, 1997). However, T₄'s rT₃ (reverse T₃) metabolism is faster than its conversion to T₃. Therefore, low T₄ levels may be present in the serum of birds when increasing amounts of rT₃ are produced (Decuyper et al., 2005). In this study, there was no statistical difference in plasma T₃ hormones in 13 individuals except 2 individuals. The increase in plasma T₃ hormones in these 2 individuals seems to be related to the increase in energy expenditure with restlessness.

Stress has an inhibitory effect on thyroid function in birds. Plasma cortisol levels also increase with stress. Increased plasma cortisol level can lead to inhibition of thyroid hormone production or a decrease in deiodination of T₄ to T₃ (Chastain and Panciera, 1995; Palme et al., 2005). Therefore, high cortisol levels may result in decreased T₄ and increased T₃ in serum, or both to decrease (Baos et al., 2006). It has been reported that the increases in T₃ are due to the increase in energy expenditure caused by the stress of the animal (Angelier et al., 2016; Fischer and Romero, 2018; Helmreich et al., 2006; Wentworth et al., 1986; Zoeller et al., 2007). Groscolas and Leloup (1989) found that in captivity Emperor penguins (*Aptenodytes forsteri*) had three times lower plasma T₄ concentrations than free-living penguins. It is known that cortisol levels increase in birds in captivity or due to activities such as ringing, holding taking blood, and there are many studies on this (Walker et al., 2005). However, studies on the effects of thyroid hormones in birds kept in captivity are not enough yet. Bennett et al. (2012), in a study they conducted with seal pups (*Halichoerus grypus*), suggested that during the research, the researchers' movement in the

colony for blood sampling and morphological measurements could only cause a general disturbance to the colony. In the present study, it is thought that the changes in plasma T₃ and T₄ hormones are caused by the increased metabolic needs of the birds, and the disturbance caused by the researchers for blood intake does not affect the levels of thyroid hormones in the birds. DeRango et al. (2019) in a study with fur seals (*Arctocephalus philippii townsendi*) found a positive relationship with T₄ and rT₃ in adult females and a negative relationship with T₃ in response to capture stress. In the present study, the increase of T₄ and lower T₃ suggest that it is due to increased metabolic needs and functions as a resource to be converted into rT₃.

Welcker et al. (2015) found a positive relationship between basal metabolic rate and T₃ in a study they conducted with *Rissa tridactyla*. They suggested that factors such as catching and holding the bird could temporarily change T₃ levels. In the present study, there was no difference in T₃ hormones except 2 healthy individuals. This difference may be due to temporarily increased basal metabolic rate changes in 2 individuals (Welcker et al., 2013; 2015).

CONCLUSION

At the end of the rehabilitation processes of the healthy Gray herons in this study, it was aimed to determine the levels of thyroid hormones, which were not previously reported in the literature. Depending on the procedures applied in the center, i reported in the study, i believe the data can be evaluated as thyroid hormone values of healthy individuals. In addition, the stress they experienced during the rehabilitation process was also taken into account. In addition, these data may not fully represent the expected values for free-flying Gray herons under natural conditions, due to the individual effects of feeding and captivity stress. Due to the low number of subjects in the study, these data i present can be evaluated as preliminary data for

studies that can be carried out with a larger number of subjects.

In conclusion, I believe that plasma thyroid hormone values determined with healthy wild Gray herons in this study will contribute to the evaluation of similar studies to be conducted in the future, in the sense of “reference values” as the first reported data.

ACKNOWLEDGMENT

I greatly appreciated to Assoc. Prof. Dr. Alp ERİLLİ (Cumhuriyet University) in the course of evaluating the data. For supporting this study, I would like to thank Prof. Dr. Sena ÇENESİZ & Prof. Dr. Metin ÇENESİZ (Ondokuz Mayıs University), Prof. Dr. Erdoğan UZLU (Balıkesir University), Assoc. Prof. Dr. Metin ÖĞÜN (Kafkas University).

Ethical approval: Studies were performed by Kafkas University Local Ethics Committee for Animal Experiments (KAÜ-HADYEK/2019-134).

Conflict of interest: No potential conflict of interest was reported by the author.

KAYNAKLAR

- Angelier, F., Parenteau, C., Ruault, S., & Angelier, N. (2016).** Endocrine consequences of an acute stress under different thermal conditions: A study of corticosterone, prolactin, and thyroid hormones in the pigeon (*Columbia livia*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 196, 38-45. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.02.010
- Baos, R., Blas, J., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A., & Hiraldo, F. (2006).** Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling White storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. *Environmental Health Perspectives*, 114(10), 1497-1501. DOI: 10.1289/ehp.9099
- Bennett, V.J., Fernández-Juricic, E., Zollner, P.A., Beard, M.J., Westphal, L., & Fisher, C.L. (2011).** Modelling the responses of wildlife to human disturbance: An evaluation of alternative management scenarios for black-crowned night-herons. *Ecological Modelling*, 222(15), 2770-2779. DOI:10.1016/J.ECOLMODEL.2011.04.025
- Bennett, K.A., Moss, S.E.W., Pomeroy, P., Speakman, J.R., & Fedak M.A. (2012).** Effects of handling regime and sex on changes in cortisol, thyroid hormones and body mass in fasting grey seal pups. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 161(1), 69-76. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.09.003.

- Cherel, Y., Durant, J.M., & Lacroix, A. (2004).** Plasma thyroid hormone pattern in king penguin chicks: a semi-altricial bird with an extended posthatching developmental period. *General and Comparative Endocrinology*, 136(3), 398-405. DOI: 10.1016/j.ygcen.2004.02.003.
- Chastain, C.B., & Panciera, D.L. (1995).** Hypothyroid diseases. 4th edition in: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Chapter 115: Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Saunders Company, Philadelphia.
- Chastel, O., Lacroix, A., & Kersten, M. (2003).** Pre-breeding energy requirements: thyroid hormone, metabolism and the timing of reproduction in house sparrows *Passer domesticus*. *Journal of Avian Biology*, 34(3), 298-306.
- Cooke, P.S., Holsberger, D.R., Witorsch, R.J., Sylvester, P.W., Meredith, J.M., Treinen, K.A., & Chapin, R.E. (2004).** Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194(3), 309-335. DOI: 10.1016/j.taap.2003.09.016.
- Davis, G.S., Anderson, K.E., Carroll, A.S. (2000).** The effects of long-term caging and molt of single comb white leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. *Poultry Science*, 79(4), 514-518. DOI: 10.1093/ps/79.4.514.
- Decuyper, E.P., Geyten, S.V., & Darras, V.M. (2005).** Thyroid hormone availability and activity in avian species: A review. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(1), 63-77. DOI: 10.1016/j.domaniend.2005.02.028.
- Elliott, K. H., Welcker, J., Gaston, A.J., Scott, A.H., Palace, V., Hare, J.F., Speakman, J.R., & Anderson, W.G. (2013).** Thyroid hormones correlate with resting metabolic rate, not daily energy expenditure, in two Charadriiform seabirds. *Biology Open*, 2(6), 580-586. DOI: 10.1242/bio.20134358
- DeRango, E. J., Greig, D.J., Galvez, C., Norris, T.A., Barbosa, L., Elorriaga-verplancken, F.R., & Crocker D.E. (2019).** Response to capture stress involves multiple corticosteroids and is associated with serum thyroid hormone concentrations in Guadalupe fur seals (*Arctocephalus philippii townsendi*). *Marine Mammal Science*, 35(1), 72-92. DOI: 10.1111/mms.12517
- Everds, N. C., Snyder, P.W., Bailey, K.L., Bolon, B., Creasy, D.M., Foley, G.L., Rosol, T.J., & Sellers, T. (2013).** Interpreting stress responses during routine toxicity studies: A review of the biology, impact, and assessment. *Toxicologic Pathology*, 41(4), 560-614. DOI: 10.1177/0192623312466452.
- Fischer, C.P., & Romero, L.M. (2018).** Chronic captivity stress in wild animals is highly species-specific. *Conservation Physiology*, 7(1), 1-38. DOI: 10.1093/conphys/coz093
- Groscolasand, R., & Leloup, J. (1989).** The effect of severe starvation and captivity stress on plasma thyroxine and triiodothyronine concentrations in an Antarctic bird (Emperor Penguin). *General and Comparative Endocrinology*, 73(1), 108-117. DOI: 10.1016/0016-6480(89)90061-0
- Guerra, R.R., Glenison, F.D., Bernadino, G.S.M., Nailson, A.N.J., Guerra, F.V.F.M., Satake, F. & (2018).** Hematological standards, hormonal indexes and gonadal morphology of roadside Hawks (*Rupornis magnirostris*). *Archives of Veterinary Science*, 23(1), 63-76. DOI: 10.5380/avs.v23i1.58580
- Harr, K.E. (2002).** Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3): 140-151. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2002.tb00295.x.
- Helmreich, D., Crouch, M., Dorr, N., & Parfitt, D. (2006).** Peripheral triiodothyronine (T₃) levels during escapable and inescapable shock. *Physiology and Behaviour*, 87(1), 114-119. DOI:10.1016/j.physbeh.2005.09.010
- Helmreich, D., Parfitt, D., Lu, X.Y., Akil, H., & Watson, S. (2005).** Relation between the hypothalamic-pituitary- thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology*, 81(3), 183-192. DOI: 10.1159/000087001.
- Hudelson, K.S., & Hudelson, P.M. (2009).** Endocrine considerations. *Clinical Avian Medicine*, 11, 541-558.
- Kaneko, J.J. (1997).** *Serum proteins and the dysproteins. 5th ed. In: Kaneko J.J., J.W. Harvey, M.L. Bruss (Eds). Clinical Biochemistry of Domestic Animals - 6th Edition*, San Diego, CA: Academic Press.
- Morgan, K.N., & Tromborg, C.T. (2007).** Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3), 262-302. DOI:10.1016/j.applanim.2006.05.032
- Nakao, N., Ono, H., & Yoshimura, T. (2008).** Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction*, 136(1), 1-8. DOI: 10.1530/REP-08-0041
- Palme, R.S., Rettenbacher, C.T., EL-Bahr, S.M., & Möstl, E. (2005).** Stress hormones in mammals and birds. comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Science*, 1040, 162-171. DOI: 10.1196/annals.1327.021
- Scanes, C.G., & McNabb, F.M.A. (2003).** Avian models for research in toxicology and endocrine disruption. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 14 (1), 21-52. DOI:10.3184/147020603783727021
- Schmidt, R.E., & Reavill, D.R. (2008).** The avian thyroid gland. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(1), 15-23. DOI:10.1016/j.cvex.2007.09.008
- Sørmo, E.G.V., Jüssi, I., Jüssi, M., Then, M.B., Skaare, J.U., & Jensen, B.M. (2005).** Thyroid hormone status in Gray seal (*Halichoerus grypus*) pups from the Baltic Sea and the Atlantic Ocean in relation to organochlorine pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(3), 610-616. DOI:10.1897/04-017R.1
- Spagnolo, V., Crippa, V., Marzia, A., & Sartorelli, P. (2006).** Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 82-87. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00092.x.

- Totzke, U., Fenske, M., Huppopp, O., Raabe, H., & Schach, N. (1999).** The influence of fasting on blood and plasma composition of Herring Gulls (*Larus argentatus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(4), 426-437. DOI: 10.1086/316675
- Walker, B.G., Boersma, P.D., & Wingfield, J.C. (2005).** Field endocrinology and conservation biology. *Integrative and Comparative Biology*, 45(1), 12-18. DOI: 10.1093/icb/45.1.12
- Welcker, J., Chastel, O., Gabrielsen, G.W., Guillaumin, J., Kitaysky, A.S., Speakman, J.R., Tremblay, Y., & Bech, C. (2013).** Thyroid hormones correlate with basal metabolic rate but not field metabolic rate in a wild bird species. *PlusOne*, 8(2), 1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0056229
- Welcker, J., Speakman, J.R., Elliot, K.H., Hatch, S.A., & Kitaysky, A.S. (2015).** Resting and daily energy expenditures during reproduction are adjusted in opposite directions in free-living birds. *Functional Ecology*, 29(2), 250-258. DOI: 10.1111/1365-2435.12321
- Wentworth, B.C., & Ringer, R.K. (1986).** *Thyroids. 4th ed. In: Sturkie PD (ed). Avian Physiology*, New York: Springer-Verlag.
- Zoeller, R.T., Tan, S.W., & Tyl, R.W. (2007).** General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Critical Reviews Toxicology*, 37(1-2), 11-53. DOI: 10.1080/10408440601123446.

Serum iron, copper and zinc concentrations in neonatal lambs naturally infected with *Cryptosporidium parvum*

Research Article

Ceren Dinler Ay

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

ORCID-

[0000-0002-0706-1856](https://orcid.org/0000-0002-0706-1856)

Correspondence

Ceren DİNLER AY

ceren.dinler@adu.edu.tr

Article info

Submission: 02-09-2021

Accepted: 07-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the serum concentration of iron, copper and zinc in neonatal lambs naturally infected with *Cryptosporidium parvum*, and to determine the relations between these trace elements and the clinical severity of the disease. For this purpose, neonatal lambs infected with *Cryptosporidium parvum* (n=27) and healthy control lambs (n=10) were evaluated. Faecal consistency, willingness to rise, stance when up, appetite, attitude, and hydration status were scored within the scope of clinical examination in infected lambs. Thus, clinical health scores were calculated for each lamb to quantify the clinical severity of the disease. Iron, copper and zinc concentrations were measured from serum samples of lambs in both groups. Compared to the healthy control lambs, serum iron and zinc concentrations were significantly lower in infected lambs ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively), while there was no difference between the two groups in terms of serum copper concentrations. Additionally, a significant negative correlation ($r = -0.60$; $p < 0.001$) was observed between serum zinc concentration and clinical health score, whereas the serum iron ($r = -0.359$; $p = 0.066$) and copper ($r = 0.322$; $p = 0.102$) concentrations did not significantly correlate with clinical health score. In conclusion, the obtained results of the study provide valuable information about trace elements status in lambs with cryptosporidiosis.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, lambs, iron, copper, zinc

INTRODUCTION

Cryptosporidium species are protozoan parasites that infect a broad range of hosts including humans and animals worldwide, causing asymptomatic or mild-to-severe gastrointestinal disease in their host species (Robertson et al., 2014; Ryan et al., 2016). *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) was detected as a primary etiological agent in neonatal diarrhoea of calves, lambs and kids (de Graaf et al., 1999). This protozoon invades epithelial cells primarily in the distal small intestine, and it destroys intestinal epithelia resulting in a reduction of enzymatic activity and a decrease in the absorptive surface, finally leading to maldigestion and malabsorption followed by osmotic diarrhoea (Certad et al., 2017; de Graaf et al., 1999). In particular, the extent and severity of the small intestine damage affect the clinical findings and clinical severity of the disease (Angus et al., 1982; de Graaf et al., 1999).

Trace elements as iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) have a significant role in metabolic function and tissue maintenance (Yatoo et al., 2013). These essential elements have important positions in continuing vital metabolic function like oxygen transport and storage, electron transport, in functions of several enzymes, oxidative metabolism, cell growth and proliferation (Beisel, 1976; Yatoo et al., 2013).

How to cite this article

Ay, C.D. (2021). Serum iron, copper and zinc concentrations in neonatal lambs naturally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 258-264. <https://doi.org/10.31797/vetbio.990194>

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



It's known that the metabolism of trace elements is significantly affected by varying degree of intestinal degenerations (Beisel, 1976). It is also reported that during the acute phase reaction, serum concentrations of these trace elements change, especially Fe and Zn serum concentrations decrease while serum Cu concentration increases (Gruys et al., 2005). Considering both the intestinal damage and acute-phase reaction caused by *Cryptosporidium*, changes in serum concentrations of these trace elements are expected. According to our knowledge, there is no study evaluating the effect of cryptosporidiosis on these trace elements in lambs.

The aim of this study was to specify the serum Fe, Cu and Zn concentrations in lambs with cryptosporidiosis, and to determine whether a relation between these elements and the clinical severity of the disease.

MATERIAL and METHOD

The animal material of this study consisted of 27 neonatal lambs naturally infected with *C. parvum* (INF group) and 10 healthy control lambs (CON group) from a commercial sheep farm in Aydın province. Lambs in the INF group were 3-20 days old and of both sexes (17 females, 10 males). The healthy CON group was selected as 6 females and 4 males at the age of 3-20 days, similar to the INF group.

Stool samples were taken directly from the rectum for diagnostic purposes from 3-20 days old neonatal lambs with varying degrees of diarrhea. Stool specimens underwent etiologic evaluation against 5 important enteropathogens (rotavirus, coronavirus, ETEC F5, *Giardia duodenalis* and *C. parvum*.) with a rapid commercial test kit (Bovid-5 Ag, Bionote, Korea). Fresh faecal smears were prepared from stool samples that test positive for *C. parvum* with the rapid test kit. It was stained with modified Ziehl Neelsen (Henriksen and Pohlenz,

1981) and carbol-fuchsin (Heine, 1982), and examined at 100 x magnifications by microscopy. The certain diagnosis was made with recognize of *Cryptosporidium* oocysts. The lambs mono-infected with only *Cryptosporidium* and who had not received any treatment before were included in the INF group of the study. Neonatal lambs who appeared clinically healthy and who did not have any agent in the stool examination both with the rapid test kit and microscopically were included in the CON group. All lambs were reared under the same husbandry conditions.

Faecal consistency, willingness to rise, stance when up, appetite, attitude, and hydration status were evaluated within the scope of clinical examination. A scale from 0 to 3 was assigned to each parameter as shown in Table 1, and thus the clinical health score (CHS) was calculated in each lamb in the INF group. The CHS applied for experimentally infected calves in previous studies (Imboden et al., 2012; Riggs and Schaefer, 2020; Schaefer et al., 2016) was slightly modified.

Blood samples collected into tubes without an anticoagulant were allowed to clot at room temperature for 1 h and then centrifuged at 3000 x g for 10 min for obtaining sera. The sera samples were stored at -20 °C until analysis for serum Fe, Cu and Zn concentrations. The serum concentrations of Fe, Cu and Zn were measured using commercially available test kits (Archem Diagnostics Ind. Ltd., Turkey) based on colorimetric methods (ferrozine, 3,5 Di-Br-PAESA and Nitro-PAPS, respectively) with autoanalyzer device (Rayto Chemray 120, China).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 (IBM Corporation, Armonk, USA). Arithmetic means and standard error of the mean (SEM), for each evaluated parameters were calculated using descriptive

statistic. The Shapiro-Wilk test was used to assess the respective data distributions for Fe, Cu and Zn concentrations within each study group. It was determined that all evaluated trace elements showed normal distribution. Therefore, the independent sample t-test was used to assess the statistical significance of these trace elements

between INF and CON groups. Also, the Pearson correlation coefficient (r) was calculated to determine the correlations between CHS and trace elements concentrations. All analyses were considered statistically significant at $p < 0.05$. All the graphics were drawn using GraphPad 8.0.2 (San Diego, CA, USA).

Table 1. Clinical health parameter evaluation and scoring modified from Imboden et al (2012), Schaefer et al (2016) and Riggs and Schaefer (2020).

Score	Fecal consistency	Willingness to rise	Stance when up	Appetite	Attitude	Hydration status
0	Normal-solid faeces	Normal-eager to rise	Normal-stable	Ravenous, consumes full basal diet, wants more	Normal bright, alert, responsive	Normal-euhydrated, asymptomatic
1	Pasty faeces	Willing to rise on own but needs prodding	Somewhat unstable	Normal-consumes basal diet, reaches satiety	Somewhat depressed, dull	Mild dehydration (~5%)
2	Liquid faeces	Reluctant to rise but able with assistance	Clearly unstable, loses balance or sways	Decreased, but if coaxed will suckle	Clearly depressed, minimally responsive	Moderate dehydration (~6–8%)
3	Watery and profuse faeces	Unwilling or unable to rise on own, requires lifting	Unable to stand on own if lifted	Anorectic, will not suckle		Severe dehydration (~9–12%)

RESULTS

The clinical examination and CHS calculation of the lambs in the INF group were performed as indicated in Table 1. In this context, it was determined that CHS ranged between 5 and 14 (9.59 ± 0.55) in naturally infected lambs with *C. parvum* included in the study.

Figure 1 demonstrates the mean \pm SEM of Fe (A), Cu (B) and Zn (C) concentrations of the lambs in the CON and INF groups. In this context; serum Fe and Zn concentrations of the INF group were statistically lower ($p=0.000$ and $p=0.024$, respectively) than those of the CON group. Also, there was no statistical difference ($p=0.761$) between the two groups in terms of serum Cu concentrations.

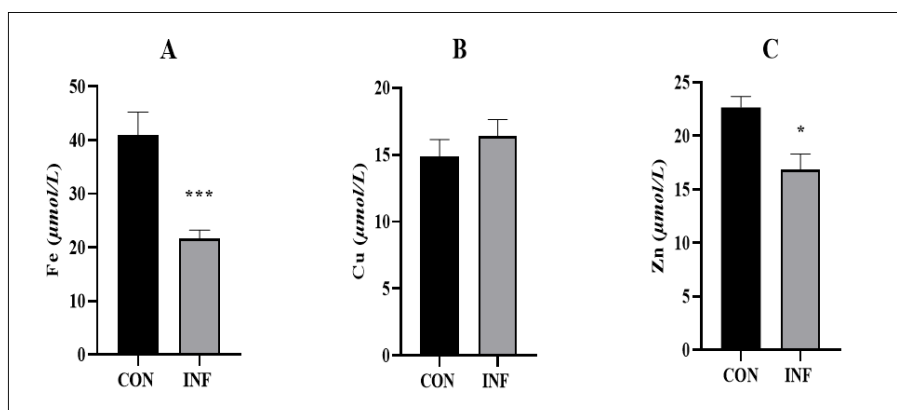


Figure 1. Mean (\pm SEM) of serum concentrations of iron (A), copper (B) and zinc (C) in healthy control (CON) and infected (INF) neonatal lambs. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Table 2 presents the result of correlation analysis between CHS and the trace elements in infected lambs. The Pearson correlation coefficient (r) results showed a significant moderate negative relation between CHS and Zn

concentration ($r = -0.60$; $p = 0.001$). Whereas, CHS did not significantly correlate with serum concentration of Fe ($r = -0.359$; $p = 0.066$) and Cu ($r = 0.322$; $p = 0.102$).

Table 2. Pearson correlation coefficients (r) between serum iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) concentrations and clinical health score (CHS) in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*.

	Trace Element	r	p
CHS	Fe	-0.359	0.066
	Cu	0.322	0.102
	Zn	-0.600	0.001

DISCUSSION

Information about the levels of serum Fe, Cu and Zn and their relationship with clinical severity of the disease in lambs naturally infected with *C. parvum* are lacking. In this study, it was shown for the first time that the serum Fe and Zn concentrations of lambs naturally infected with *C. parvum* were significantly lower than in the healthy control lambs, and serum Zn concentration correlated significantly ($r = -0.60$; $p = 0.001$) with CHS.

Several laboratory variables like trace elements are influenced by many factors such as animal species, age, gender, nutrition content etc. (Hidiroglou, 1980; Soetan et al., 2010). Variables especially in the neonatal period differ from those of adults, therefore; they should be interpreted under consideration of the animal's age. In this study, in order to eliminate these factors, the lambs in the CON group were selected to be similar to the lambs in the INF group in terms of age, gender and maintenance feeding conditions.

It is known that lambs and kids are born with adequate Fe reserve (Hidiroglou, 1980; Oliveira et al., 2012). Fe mobilization is increased to meet the physiological requirement such as growth and sufficient blood production, and replace of

foetal red blood cells with adult cells (Kojouri and Shirazi, 2007) in the neonatal period. On the other hand, Fe is not only essential for the organism but also important for many bacteria, viruses, and parasites. Several studies reported that serum concentration of Fe decreases in various infections due to nutritional immunity (Beisel, 1976). In addition, intestinal damage adversely affects the absorption of Fe, and decreases in serum Fe values develop abruptly during the incubation period of most systemic infectious processes, in some instances several days before the onset of fever or any symptoms of clinical illness (Beisel, 1976). In our study, the mean serum iron concentration of the INF group ($41.02 \pm 4.2 \mu\text{mol/L}$) was significantly ($p = 0.001$) lower than that in the CON group ($21.72 \pm 1.51 \mu\text{mol/L}$). Consistent with our findings, previous studies indicated lower serum concentration of Fe in diarrheic yaks (Han et al., 2016), in diarrheic sheep with coccidiosis (Davoodi and Kojouri 2015) and, in calves experimentally infected with *C. parvum* (Babaç, 2014) than those of the healthy subjects. Lower serum Fe concentration in the INF group in this study could be explained by the intestinal changes caused by *C. parvum* and their consequences such as systemic inflammation.

Copper is absorbed through the small intestine and, to a lesser extent, through the large intestine in sheep as other species (Turner et al., 1987). In cases of malabsorption-causing diseases such as cryptosporidiosis, Cu absorption may be expected to decrease (Turner et al., 1987). On the other hand, an increased serum level of copper due to undulating levels of copper-containing ceruloplasmin and other erythrocytic antioxidant enzymes during infection was reported (Abou-Shady et al. 2011; Ranjan et al., 2006). The lack of statistical difference between the INF group and the CON group in terms of serum Cu concentrations in this study may be related to the single or simultaneous effect of the factors mentioned above.

Zinc has a direct effect on intestinal villus, brush-border disaccharidase activity, and intestinal transport of water and electrolytes (Arora et al., 2006). This effect involves both the maintenance of the gut structure and gut immune function (Koski et al., 2003). In a study of children with enteric parasitic infections like *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* sp., the serum concentrations of Zn in infected children were found to be significantly lower than non-infected children (Yones et al., 2015). Additionally, serum Zn concentration of acute diarrhoeic children with unknown aetiology was 13.1% lower than healthy ones (Arora et al., 2006). Similar to researches on humans, the serum Zn levels of the yaks in the diarrheic group were found that significantly lower than those in the healthy control group (Han et al., 2016). The serum Zn concentrations of lambs with coccidiosis-associated diarrhoea were also lower than the after-treatment levels (Davoodi and Kojouri 2015). The decrease in serum/plasma Zn concentrations in these studies is based on loss of Zn from the gastrointestinal tract, weak Zn absorption throughout intestines, increased Zn requirement in the immunization system, and use of Zn for the synthesis of antioxidant enzymes. (Arora et al., 2006; Han et al., 2016; Yones et al.,

2015). In the present study (Fig. 1C), the lower serum Zn concentration in the INF group can also be associated with the above-mentioned mechanisms. On the other hand, it was reported that there was no significant difference between healthy control calves and experimentally infected calves with *C. parvum* in terms of serum Zn concentrations (Babaç 2014). This disparity may be related to differences in the severity of the infection, except for other reasons. Because, we also revealed a significant negative correlation ($r = -0.60$; $p < 0.001$) between serum Zn concentration and CHS, different from serum Fe and Cu concentration. This indicates a relatively lower serum Zn concentration in lambs with clinically more severe cryptosporidiosis than in those with clinically milder. This situation may be associated with the increase in excretion and consumption of Zn as a result of the morphological and inflammatory changes caused by *Cryptosporidium* in the intestines. Strand et al. (2004) report a strong association between inflammation and plasma Zn concentration in children with acute diarrhea. From another point of view, considering the direct positive effects of Zn on the intestine, low serum zinc levels of lambs with clinically severe cryptosporidiosis may have contributed to this severity of the disease, among other factors.

CONCLUSION

These alterations in serum trace elements concentrations in infected lambs may depend on the direct effect on the gastrointestinal system of *C. parvum* infection and/or its consequences. Additionally, considering that serum Zn concentration shows a negative correlation with the clinical severity of the disease in this study; the controlled studies to investigate the effect of Zn supplementation on clinical improvement in neonatal lambs with *C. parvum*-associated diarrhoea would be beneficial.

ACKNOWLEDGMENT

Ethical approval: Ethical approval was granted by the Animal Research Ethics Committee of the Aydın Adnan Menderes University, under protocol number 64583101-2021-114.

Conflict of interest: The author declares that there is no conflict of interest for this article and no financial support has been received.

KAYNAKLAR

- Abou-Shady, O., El Raziky, M. S., Zaki, M. M., & Mohamed, R. K. (2011).** Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biological trace element research*, 140(1), 1-6. doi: 10.1007/s12011-010-8673-6
- Angus, K. W., Tzipori, S., & Gray, E. W. (1982).** Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a cryptosporidium from calves with diarrhea. *Veterinary Pathology*, 19(1), 67-78. doi: 10.1177/030098588201900110
- Arora, R., Kulshreshtha, S., Mohan, G., Singh, M., Sharma, P. (2006).** Estimation of serum zinc and copper in children with acute diarrhea. *Biological trace element research*, 114(1-3), 121-126. doi:10.1385/BTER:114:1:121
- Babaç, D. (2014).** *Cryptosporidium parvum* ile *deneyisel enfekte buzağılarda serum demir, bakır ve çinko konsantrasyonlarının incelenmesi* (Publication No. VİH-YL-2014-0002) [Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi].
- Beisel, W. R. (1976).** Trace elements in infectious processes. *Medical Clinics of North America*, 60(4), 831-849. doi: 10.1016/S0025-7125(16)31864-8
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Cacciò, S. M. (2017).** Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 33(7), 561-576. doi:10.1016/j.pt.2017.02.006
- Davoodi, Z., Kojouri, G. A. (2015).** Mineral, metalloid, and heavy metal status in sheep with clinical coccidiosis. *Comparative Clinical Pathology*, 24(2), 259-262. doi: 10.1007/s00580-014-1886-x
- de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999).** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1269-1287. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00076-4
- Han, Z., Li, R., Li, K., Shahzad, M., Wang, X. Q., Jiang, W., ... & Meng, X. (2016).** Assessment of serum trace elements in diarrheic yaks (*Bos grunniens*) in Hongyuan, China. *Biological trace element research*, 171(2), 333-337. doi: 10.1007/s12011-015-0540-z
- Heine, J., 1982.** Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 29(4), 324-327. doi:10.1111/j.1439-0450.1982.tb01233.x
- Henriksen, S. A., & Pohlenz, J. F. L. (1981).** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta veterinaria scandinavica*, 22(3-4), 594. doi: 10.1186/BF03548684
- Hidiroglou, M. (1980).** Trace elements in the fetal and neonate ruminant: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, 21(12), 328.
- Imboden, M., Schaefer, D. A., Bremel, R. D., Homan, E. J., & Riggs, M. W. (2012).** Antibody fusions reduce onset of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Veterinary parasitology*, 188(1-2), 41-47. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.02.014
- Kojouri, G. A., & Shirazi, A. (2007).** Serum concentrations of Cu, Zn, Fe, Mo and Co in newborn lambs following systemic administration of vitamin E and selenium to the pregnant ewes. *Small Ruminant Research*, 70(2-3), 136-139. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.02.002
- Koski, K. G., & Scott, M. E. (2003).** Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*, 16(4), 237-251. doi: 10.1002/jtra.10043
- Oliveira, C. M. D., Rodrigues, M. N., & Miglino, M. A. (2012).** Iron transportation across the placenta. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 1115-1120. doi:10.1590/S0001-37652012005000055
- Ranjan, R., Naresh, R., Patra, R. C., & Swarup, D. (2006).** Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves. *Veterinary research communications*, 30(3), 249-254. doi: 10.1007/s11259-006-3185-8
- Riggs, M. W., & Schaefer, D. A. (2020).** Calf clinical model of cryptosporidiosis for efficacy evaluation of therapeutics. In: Mead J, Arrowood M. (eds) *Cryptosporidium* (pp. 253-282). Humana, New York, NY.
- Robertson, L. J., Björkman, C., Axén, C., & Fayer, R. (2014).** Cryptosporidiosis in farmed animals. In *Cryptosporidium: parasite and disease* (pp. 149-235). Springer, Vienna.
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, A. (2016).** *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite immunology*, 38(9), 535-547. doi: 10.1111/pim.12350
- Schaefer, D. A., Betzer, D. P., Smith, K. D., Millman, Z. G., Michalski, H. C., Menchaca, S. E., Zambriski, J. A., Ojo, K. K., Hulverson, M. A., Arnold, S. L. M., Rivas, K. L., Vidadala, R. S. R., Huang, W., Barrett, L. K., Maly, D. J., Fan, E., Van Voorhis, W. C., Riggs, M. W. (2016).** Novel bumped kinase inhibitors are safe and effective therapeutics in the calf clinical model for cryptosporidiosis. *The Journal of infectious diseases*, 214(12), 1856-1864. doi: 10.1093/infdis/jiw488
- Soetan, K. O., Olaiya, C. O., & Oyewole, O. E. (2010).** The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants—A review. *African journal of food science*, 4(5), 200-222. doi: 10.5897/AJFS.9000287

- Strand, T. A., Adhikari, R. K., Chandyo, R. K., Sharma, P. R., & Sommerfelt, H. (2004).** Predictors of plasma zinc concentrations in children with acute diarrhea. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 451-456. doi: 10.1093/ajcn/79.3.451
- Turner, J. C., Shanks, V., Osborn, P. J., & Gower, S. M. (1987).** Copper absorption in sheep. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 86(1), 147-150. doi:10.1016/0742-8413(87)90157-5
- Yatoo, M. I., Saxena, A., Deepa, P. M., Habeab, B. P., Devi, S., Jatav, R. S., & Dimri, U. (2013).** Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary world*, 6(12), 963. doi:10.14202/vetworld.2013.963-967
- Yones, D. A., Galal, L. A., Abdallah, A. M., & Zaghlol, K. S. (2015).** Effect of enteric parasitic infection on serum trace elements and nutritional status in upper Egyptian children. *Tropical parasitology*, 5(1), 29. doi: 10.4103/2229-5070.145581

Heat stress, intestinal barrier disruption and calves: multidisciplinary perspective field study

ABSTRACT

Intestinal barrier might be deteriorated by heat stress (HS) that is important disruption factor affected animal productivity, as resulted leaky gut in cattle. Therefore, the aim of this study is to demonstrate that the intestinal barrier is disrupted by HS detected by the zonulin, as an intestinal permeability biomarker. The study was conducted in local farm in the Aydın Province of Turkey in August that had the average highest temperature [41.1°C (36-44°C)] with %36 humidity recorded by the meteorological data. Further, serum zonulin levels were assessed by ELISA. Serum zonulin (ng/ml) levels increased (60,07 ± 21,20) at mid night 00.00 am in contrast to mid-day values at 12.00 pm (34,60 ± 10,90) (p=0,018). Regarding increased zonulin levels indicated that disrupted intestinal barrier with increasing intestinal permeability and it might be affected to reduced productivity of lactation cattle with HS during hotter summer monthHS in Aegean Region in Turkey. Therefore, preventive measures should be taken reflected to HS.

Keywords: Cattle; heat stress; leaky gut; zonulin

INTRODUCTION

Considering global warming (Schär et al., 2004) and demanding of production animals with intensive breeding (Renaudeau et al., 2012), dairy industry is facing HS to being significant environmental challenge. Unsurprisingly, geographic areas where long hot summer climates having with higher humidity as like Turkey is more exposed to these challenges (Schüller et al., 2014; Duru, 2018; Demirhan and Şahinler, 2019). High milk production cattle have more vulnerable to HS related to increasing heat production by yield and small surface: volume ratio that limited to heat dissipation (Chebel et al., 2004). This resulted as accommodation of the heat toward the periphery but reducing the blood flow in especially splanchnic area that inducing gut permeability (Hall et al., 2001; Lambert, 2009; Gupta et al., 2017). On the other hand, apart from the hypoxia, one of the factors that created intestinal permeability is direct effect of HS on intestinal barrier integrity with triggering the shift of the inflammatory cells for maintaining the homeostasis to the region against penetration of the toxin and bacteria (Koch et al., 2019). Heat stress is an important factor on cattle production that to be abating welfare, health and reproduction and the most well-known among these is reducing milk yield and the economic losses associated with all impacts (Gernand et al., 2019; Fabris et al., 2020; Tao et al., 2020).

How to cite this article

Ural, DA., Erdoğan, S., Erdoğan, H., Ural K. (2021). Heat stress, intestinal barrier disruption and calves: multidisciplinary perspective field study. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 265-269. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1004746>

Research Article

Deniz Aliç-Ural^{1a}
Songül Erdoğan^{2b}
Hasan Erdoğan^{2c}
Kerem Ural^{2d}

¹Faculty Farm, Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Faculty, Aydın, Turkey

²Department of Internal Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Faculty Aydın, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-2659-3495](https://orcid.org/0000-0002-2659-3495)

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

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

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

Correspondence

Deniz ALIÇ URAL
alicdeniz@gmail.com

Article info

Submission: 05-10-2021

Accepted: 09-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



Weather of the Aegean Region in Turkey is subtropical and heat weather increasing steadily in year to year and it has been recorded the highest temperatures in recent years due to global warming (Demirtaş, 2017; Ertugrul et al., 2021). HS has a negative impact on dairy lactation cattle in Turkey as in World. Considering this, we aimed to effect of HS on zonulin levels which is intestinal permeability biomarker and to generated preliminary data for implicating intestinal impairment related to HS.

MATERIAL and METHOD

Demographic Data

The study was performed in a commercial unit rearing calves located in Aegean Region of Turkey. Aydin city, is very well known by Mediterranean climatic conditions (i.e. summers are extremely hot and dry). The most elevated temperature in the city is recorded in July with an annual average temperature of 31.0 °C between 1991-2020.

The farm composed of 47 apparently healthy calves, to those of which 40-70 days old ones were involved at the present study. Solely 7 healthy calves (5 female, 2 male) were enrolled, due to limited ELISA options (Figure 1).



Figure 1. Heat stress may be tolerated in a self-manner, although apparently healthy calves were evident. In the present study 2 of 7 calves were enrolled, showed varying degree of respond to heat stress.

Weather Conditions During the Present Field Study

Given the equivalent temperature index (ETIC) for cattle (Wang et al., 2018) this reference tool [mild-- 23° C ≤ETIC<26 ° C, moderate--26° C

≤ETIC<31 ° C, severe-- 31° C ≤ETIC<37° C and emergency-- ETIC>37 ° C] was taken into consideration while performing this field trial. In this field study present data was obtained at 12 pm and 00 am with temperature records of 42°C and 31°C respectively, on 5 August, Friday 2021, indicated that cows enrolled were severe and emergency affected, respectively, by HS.

Blood Sampling and Analytes

Blood was withdrawn from *Vena jugularis* into anticoagulated tubes twice a day at 12 pm and 00 am at 05.08.2021. Sera was freshly dispersed and thereafter kept at refrigerator. Bovine zonulin ELISA Kit (MyBiosource ELISA kits) were purchased commercially. ELISA analysis of serum zonulin levels were performed.

Statistical Analyses

All data was tabulated as mean and standard deviation. Normality tests of the data within the hours in same animals were determined by Shapiro-Wilk test. Comparisons between different measurement times were conducted by Wilcoxin test. All statistical analyses were performed by program SPSS 22.0 (IBM, USA) and $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

Serum zonulin concentrations to those of apparently healthy 7 Holstein calves were deemed available to observe on liner graphic at Fig 2. To those of calves serum zonulin (ng/ml) $\bar{X} \pm SD$ levels at midnight 00.0, as end point, were whole lower than what else measured at basal values at mid-day 12.00, as starting point, showing that HS markedly influence on circulating zonulin levels. Table 1 presented statistical interpretation of serum zonulin (ng/ml) $\bar{X} \pm SD$ levels prior to and there after.

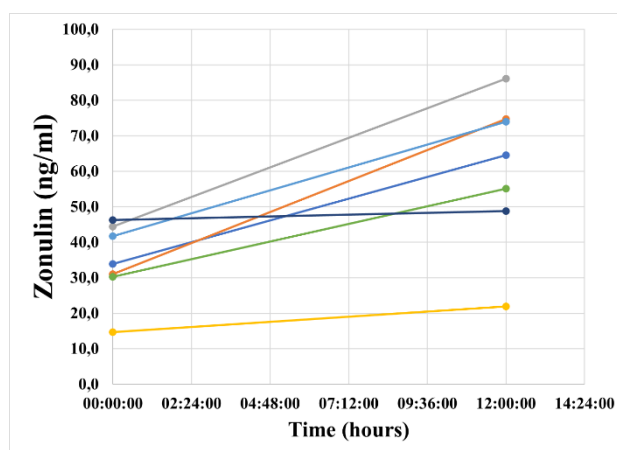


Fig.2. Linear graphic showing evidenced proof of circulating (and thereof fluctuating) serum zonulin levels (measured at mid-day 12.00 as starting point and midnight 00.0 as end point) in 7 calves enrolled at the present study.

Table 1. Statistical interpretation of serum Zonulin (ng/ml) $\bar{X} \pm SD$ levels prior to measurement at mid-day 12.00 as starting point and there after midnight 00.0 as end point

	Hour		<i>p</i> value
	12:00	00:00	
Zonulin (ng/ml) $\bar{X} \pm SD$	60,07 \pm 21,20	34,60 \pm 10,90	0,018

DISCUSSION

Vulnerability to high climatic conditions could probably foist health and physiological stress-related conditions both in humans and animals. Furthermore, the gastrointestinal system is one of the foremost organs affected (Lambert, 2009). In the present study as natural model, Aydin Municipality presents natural climatic conditions, in which obtained results would have probably change management practices, hastening probable expected preventive measures. By our natural design, our HS protocol involved marked hyperthermia as evidenced by elevated rectal temperatures (not the subject of this field trial, however would be the purpose of our subsequent study and probable projects) and respiration rates (this data was also not necessary to shown) as was also reported previously. Other relevant effect of HS was diminished feed intake. This was briefly explained by the link between decreased appetite as a probable strategy for minimizing metabolic heat production (Pearce et al., 2013). Dairy calves were born in summer were prone to present lower average daily gain

in contrast to those were born in winter (Place et al., 1998). As calves devour a certain volume of milk/milk replacer and starter *ad libitum* daily, HS could probably alter dry matter intake in calves at the starter. Calves were born in summer presented lower starter dry matter intake in contrast to others were born in winter (Rauba et al., 2019). Calves under HS existed diminished starter intake in comparison to others growth under moderate conditions (Broucek et al., 2009). Holstein heifers under HS (32.5 to 34 °C environment) presented lower feed intake, average daily weight gain and feed efficiency in contrast to other ones at cooler conditions (18 to 20 °C environment) (Baccari et al., 1983). Although not reported in our study (data not analyzed) decreased starter intake and thereafter decreased appetite was observed by the field veterinarian during study, which may be briefly related to HS.

The proposed mechanisms in which HS disrupts intestinal permeability, although not clearly elucidated, might involve inflammation and hypoxia modulate intestinal tight junction

(tJ) proteins heat shock proteins and hypoxia-inducible factor (Yamagata et al., 2004; Turner, 2006; Qi et al., 2011). Furthermore, sequel of intestinal permeability changes involves nutrient digestibility alterations and absorption across the intestinal epithelium along with a hypothesis of an acute heat-load could deleteriously change intestinal integrity causing endotoxemia and inflammation (Pearce et al., 2013). In the present study serum zonulin (ng/ml) levels $\bar{X} \pm SD$ decreased ($60,07 \pm 21,20$) at mid night 00.00 am in contrast to mid-day values at 12.00 pm ($34,60 \pm 10,90$) ($p=0,018$). Elevated zonulin levels indicated that disrupted intestinal barrier and increasing intestinal permeability, as was below proposed mechanisms might participate.

One might speculate that calves and probably heifers engender fewer metabolic heat and exist larger body surface area in association with body mass, furthermore efficiently vanishing body heat and furthermore suggested to be more tolerant of HS in contrast to cattle (West, 2003). On the other hand, scientific data evidenced that HS might affect physiology, feed conversion efficiency, rumen of calves and heifers (Colditz and Kellaway, 1972). All aforementioned factors might alter their future productive life, in which calves under HS should be monetarized. A better understanding of HS influence on calves should be of beneficial (Beede and Collier, 1986, Wang et al., 2020). The purpose of our subsequent study would handle this idea.

ACKNOWLEDGMENT

Ethical approval: This study was approved by Local Ethical Committee of University with 64583101/2021/107.

Conflict of interest: There is no conflict of interest between the authors

REFERENCES

- Baccari Jr, F., Johnson, H. D., & Hahn, G. L. (1983).** Environmental heat effects on growth, plasma T3, and postheat compensatory effects on Holstein calves. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 173(3), 312-318.
- Beede, D. K., & Collier, R. J. (1986).** Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, 62(2), 543-554.
- Broucek, J., Kisac, P., & Uhrincat, M. (2009).** Effect of hot temperatures on the hematological parameters, health and performance of calves. *International Journal of Biometeorology*, 53(2), 201-208.
- Chebel, R. C., Santos, J. E., Reynolds, J. P., Cerri, R. L., Juchem, S. O., & Overton, M. (2004).** Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 84(3-4), 239-255.
- Colditz, P. J., & Kellaway, R. C. (1972).** The effect of diet and heat stress on feed intake, growth, and nitrogen metabolism in Friesian, F₁ Brahman × Friesian, and Brahman heifers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 23(4), 717-25.
- Demirhan, S. A., & Şahinler, N. (2019).** Effects of global warming on animal breeding. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(1), 157-160.
- Duru, U., Arabi, M., & Wohl, E. E. (2018).** Modeling stream flow and sediment yield using the SWAT model: a case study of Ankara River basin, Turkey. *Physical Geography*, 39(3), 264-289.
- Ertugrul, M., Varol, T., Ozel, H. B., Cetin, M., & Sevik, H. (2021).** Influence of climatic factor of changes in forest fire danger and fire season length in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(1), 1-17.
- Fabris, T. F., Laporta, J., Skibieli, A. L., Dado-Senn, B., Wohlgemuth, S. E., & Dahl, G. E. (2020).** Effect of heat stress during the early and late dry period on mammary gland development of Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8576-8586.
- Gernand, E., König, S., & Kipp, C. (2019).** Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6660-6671.
- Gupta, A., Chauhan, N. R., Chowdhury, D., Singh, A., Meena, R. C., Chakrabarti, A., & Singh, S. B. (2017).** Heat stress modulated gastrointestinal barrier dysfunction: role of tight junctions and heat shock proteins. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(12), 1315-1319.
- Hall, D. M., Buettner, G. R., Oberley, L. W., Xu, L., Matthes, R. D., & Gisolfi, C. V. (2001).** Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280(2), H509-H521.

- Koch, F., Thom, U., Albrecht, E., Weikard, R., Nolte, W., Kuhla, B., & Kuehn, C. (2019).** Heat stress directly impairs gut integrity and recruits distinct immune cell populations into the bovine intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10333-10338.
- Lambert, G. P. (2009).** Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *Journal of Animal Science*, 87(14), 101-108.
- Pearce SC, Mani V, Boddicker RL, Johnson JS, Weber TE, Ross JW, & Gabler, N. K. (2013).** Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *PLOS One* 8(8), 1-9.
- Place, N. T., Heinrichs, A. J., & Erb, H. N. (1998).** The effects of disease, management, and nutrition on average daily gain of dairy heifers from birth to four months. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 1004-1009.
- Qi, H., Wang, P., Liu, C., Li, M., Wang, S., Huang, Y., & Wang, F. (2011).** Involvement of HIF-1 α in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(3-4), 251-262.
- Rauba, J., Heins, B. J., Chester-Jones, H., Diaz, H. L., Ziegler, D., Linn, J., & Broadwater, N. (2019).** Relationships between protein and energy consumed from milk replacer and starter and calf growth and first-lactation production of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 301-310.
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., De Basilio, V., Gourdine, J. L., & Collier, R. J. (2012).** Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707-728.
- Schär, C., Vidale, P. L., Lüthi, D., Frei, C., Häberli, C., Liniger, M. A., & Appenzeller, C. (2004).** The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature*, 427(6972), 332-336.
- Schüller, L. K., Burfeind, O., & Heuwieser, W. (2014).** Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology*, 81(8), 1050-1057.
- Tao, S., Rivas, R. M. O., Marins, T. N., Chen, Y. C., Gao, J., & Bernard, J. K. (2020).** Impact of heat stress on lactational performance of dairy cows. *Theriogenology*, 150, 437-444.
- Turner, J. R. (2006)** Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American Journal of Pathology*. 169, 1901–1909.
- Wang, X., Gao, H., Gebremedhin, K. G., Bjerg, B. S., Van Os, J., Tucker, C. B., & Zhang, G. (2018).** A predictive model of equivalent temperature index for dairy cattle (ETIC). *Journal of Thermal Biology*, 76, 165-170.
- Wang, J., Li, J., Wang, F. Xiao, J., Wang, Y., Yang, H., ... & Cao, Z. (2020).** Heat stress on calves and heifers: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1-8.
- West, J. W. (2003).** Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 86(6), 2131–44.
- Yamagata, K., Tagami, M., Takenaga, F., Yamori, Y., & Itoh, S. (2004).** Hypoxia-induced changes in tight junction permeability of brain capillary endothelial cells are associated with IL-1 β and nitric oxide. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 491-499.

Koçlarda spermaya katılan CAPE'in (Kafeik asit fenil ester) dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri

The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) addition on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in ram semen

ÖZET

Bu çalışmanın amacı koç sperma sulandırıcısına ilave edilen farklı dozlardaki Kafeik asit fenil ester (CAPE) çözümü sonu spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Ejakulatlar beş baş Merinos koçtan haftada bir kez suni vajen yardımıyla toplandı ve bu işlem altı kere tekrarlandı. Ejakulatlar ml'de 150×10^6 spermatozoon olacak şekilde antioksidan içermeyen (kontrol) ve antioksidan içeren (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$) sulandırıcılar ile dört bölüme ayrıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında donduruldu. Subjektif motilite yönünden 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı ($P < 0.05$) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 $\mu\text{g/ml}$ içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ içeren gruplardaki azalma önemli ($P < 0.05$) bulundu. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış, tail length, tail DNA ve tail moment bakımından kontrol grubuna göre 100 $\mu\text{g/ml}$ CAPE içeren gruptaki azalmalar ve kontrol grubuna göre spermatozoon TAS düzeylerinde 10 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ CAPE içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki CAPE'in 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, HOST-Eozin test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Gölbaşı Gölü, kondisyon faktörü, sıcaklık, tatlı su midyesi, *Unio terminalis*

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the effects of different doses caffeic acid phenethyl ester (CAPE) adding to extender on some spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage during post-thawed of ram semen. Ejaculates were collected from five Merino rams using an artificial vagina ones a week and this process was repeated six times. Ejaculates were split into four aliquots and diluted to a final concentration of 150×10^6 spermatozoa/ml with the base extender containing antioxidant (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$) and no additive (control). All samples were cooled to 4°C and equilibrated for 3 h then were loaded into 0.25 ml straws and frozen using a liqued nitrogen vapour and plunged into liquid nitrogen. In terms of subjective motility, the groups containing 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ were found to be significantly superior ($P < 0.05$) compared to the control group. In addition, in terms of mid-piece anomalies and total abnormal spermatozoon rate, the decrease in the group containing 100 $\mu\text{g/ml}$ compared to the control group and in the groups containing 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ in terms of tail anomalies was found to be significant ($P < 0.05$). The increase in all antioxidant groups in terms of H + / E- ratio compared to the control group, decreases in the group containing 100 $\mu\text{g/ml}$ CAPE compared to the control group in terms of tail length, tail DNA and tail moment, and the spermatozoon TAS levels in the groups containing 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ CAPE compared to the control group. the increase was statistically significant ($P < 0.05$). In conclusion, in our study, it was observed that the 100 $\mu\text{g/ml}$ dose of CAPE in different doses added to the sperm in the storage of ram semen provided the best protection compared to the control group and other groups in terms of spermatozoon motility, abnormal spermatozoon rate, HOST-Eosin test rate, oxidative stress and DNA damage.

Keywords: Condition factor, freshwater mussel, Gölbaşı Lake, temperature, *Unio terminalis*

How to cite this article

Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Hazman, Ö. (2021). The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) addition on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in ram semen. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 270-277. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1008995>

Research Article

Mustafa Gündoğan^{1a}
Deniz Yeni^{1b}
Fatih Avdatek^{1c}
Ömer Hazman^{2d}

¹Afyon Kocatepe University
Veterinary Faculty
Reproduction and Artificial
Insemination Department,
Afyonkarahisar, Turkey
²Afyon Kocatepe
University, Faculty of
Science and Arts,
Department of Chemistry,
Biochemistry Division,
Afyonkarahisar, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-3292-4625](https://orcid.org/0000-0002-3292-4625)

^b[0000-0002-9105-5677](https://orcid.org/0000-0002-9105-5677)

^c[0000-0003-2345-8826](https://orcid.org/0000-0003-2345-8826)

^d[0000-0002-2702-6847](https://orcid.org/0000-0002-2702-6847)

Correspondence

Fatih AVDATEK

favdatek@aku.edu.tr

Article info

Submission: 13-10-2021

Accepted: 13-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution

4.0 International License



GİRİŞ

Koçlarda üreme üzerinde en önemli etkenlerden biri diğer türlerde olduğu gibi, sperma kalitesi ve spermatolojik özellikleridir. Bu parametrelerin tam olarak ortaya koyabilmek için gerek nativ olarak suni tohumlama uygulamasında gerekse dondurularak saklanması çalışmalarında koç spermasını uygun sulandırıcı kompozisyonları ile sulandırılması gerekmektedir. Çünkü günümüzde hala koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanması çalışmalarında farklı sulandırıcı kompozisyonları ve yöntemleri kullanılmaktadır.

Sulandırıcı içerisinde kullanılan maddelerin spermatozoonlar üzerine olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için sulandırıcı kompozisyonuna çeşitli şekerler veya antioksidan özelliği bilinen katkı maddeleri ilave edilmektedir. Bu sayede dondurma sırasında normal değerlerden çok daha fazla meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) spermatozoonların fertilizasyon yeteneklerine negatif yönde ciddi etkileri oluşmaktadır. Oksijen, hücreler tarafından oksidatif fosforilasyon yoluyla bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Bu süreçte, ATP üretimi, iki H₂O molekülü oluşturmak için O₂'ye dört elektron ve dört protonun eklendiği bir reaksiyonla birleştirilir. Ancak bir O₂ molekülü, süperoksit anyonu (O₂ • -) oluşturmak için yalnızca bir elektron kazandığında bu reaktif oksijen türü (ROS), H₂O oluşturmak için üç elektron ve dört proton daha kazanma eğilimindedir. Bu işlem birkaç reaksiyon içerir ve hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikal (OH •) ve peroksinitrit (ONOO-) gibi diğer ROS üretimiyle sonuçlanır. Kontrollü ROS üretimi önemli bir fizyolojik role sahip olmasına rağmen, hücresel antioksidan savunma tarafından dengelenmeyen yüksek ROS üretimi oksidatif strese neden olur.

Oksidatif stresin kanser, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi / reperfüzyon hasarı, diabetes mellitus, nörodejeneratif bozukluklar, romatoid artrit ve yaşlanma gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Buna göre antioksidanlar, çeşitli hastalık koşullarında önemli bir koruyucu rol oynayabilir (Reuter vd., 2010). Polifenollerin antioksidan özellikleri geniş çapta kabul edilmektedir. Kafeik asit fenil ester (CAPE), sinamik asidin bir hidroksil türevidir. CAPE, moleküler formülü C₁₇H₁₆O₄ ve moleküler ağırlığı 284.3 olan difenolik bir bileşiktir. CAPE'nin tam kimyasal adı, (E) -3-(3,4-dihidroksifenil) -2-propionik asit, 2-feniletıl 3- (3,4 dihidroksifenil) -2-propenoattır. CAPE, suda çözünmeyen ancak etanol, metanol, aseton ve DMSO'da serbestçe çözünen beyaz, ince kristal bir tozdur. Tarçın asitlerinde CH₂ = CH-COOH grubunun varlığı, benzoik asit gibi diğer fenolik asitlere kıyasla daha yüksek antioksidan kapasitesi sağlar. Fenolik hidroksillerin metil gibi komşu bir inert grup tarafından sterik engellenmesi, antioksidan aktivitesini arttırmaktadır (Widjaja vd., 2008). Difenolikler, hem serbest radikallerin yayılmasını hem de oluşum reaksiyonlarını inhibe ederek antioksidan görevi görür. Geçiş metalini şelatlama veya başlatma reaksiyonlarında yer alan enzimleri inhibe etme kapasitesine sahiptirler (Russo vd., 2000).

İn vivo deneylerde CAPE için çözücü olarak alkollerin kullanılması, transestrifikasyon yoluyla yeni kafeik asit esterleri üretebildikleri için dikkatli olunmalıdır (Celli vd., 2007). CAPE ilk olarak 1987'de propolisin bir bileşeni olarak tanımlandı (Bankova vd., 1987). CAPE, propolisten farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilebilir veya % 96 ve % 91,2 molar dönüşüm değerine sahip kafeik asit ve fenetil alkollerden yanıt yüzey metodolojisi dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle kimyasal olarak sentezlenebilir (Chen vd., 2011). Propolis özütü, ilginç antioksidan özellikler sergiler Russo vd.

(2000) CAPE içeren propolis ekstraktını, CAPE'den yoksun propolis ile karşılaştırıldığında daha belirgin antioksidan özellikler sergilediğini göstermiştir. Bu, propolisin antioksidan aktivitesinde CAPE'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Russo vd., 2002). CAPE, oksidatif hasara karşı güçlü bir antilipoperoksidatif sitoprotektif ve antijenotoksik potansiyel sergiler (Wang vd., 2010). Yapısal olarak flavonoidlerle ilişkili olarak, CAPE bal arısı propolis ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşenidir ve normal hücreler üzerinde zararlı etkileri olmayan yerel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Bileşiğin güçlü antimikrobik, anti-inflamatuar, antineoplastik ve antioksidan etkileri olduğu bilinmektedir (Koltuksuz, vd., 2000). Yağda çözünebilir bir antioksidan olan CAPE, geleneksel tıp gibi birçok iltihaplı ve bulaşıcı hastalıkta kullanılmaktadır. (Tolba, vd., 2013). Bir çalışma oksidatif stresin tedavisinde CAPE'nin iyileştirici etkilerini göstermiştir (Song vd., 2012). CAPE, geniş farmakolojik aktiviteleri, antibakteriyel, antiproliferatif, antiparazitik ve antioksidan etkileri nedeniyle dikkat çeken bir propolis bileşendir (Alday-Provencio vd., 2015). CAPE, serbest oksijen radikallerini azaltarak yararlı etkilerini gösterir ve bu antioksidan enzimlere paralel hareket ederek serbest radikal temizleme enzimlerinin tüketimini önler (Ogeturk vd., 2005). Çalışmamızın amacı koçlarda sperma sulandırıcısına ilave edilen CAPE'in spermatolojik özelliklere, oksidatif strese ve DNA hasarına etkisini ortaya koymakla beraber yapmış olduğumuz literatür taramalarında hakkında yeterli miktarda çalışma olmaması araştırmamızın orijinalliğini göstermektedir.

MATERYAL VE METOT

Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan 2-3 yaşlı 5 baş Merinos ırkı koç kullanılmıştır. Koçlardan

sperma suni vajen yardımıyla sperma alma esnasında aşım partneri olarak kızgınlığı tespit edilmiş koyun, olmadığı zamanda ise kızgınlık göstermeyen koyunlar kullanıldı. Bir yardımcı tarafından tutulan koyunun üzerine atlayan koçun penisine daha önceden hazırlanmış suni vajen usulüne uygun takılarak sperma alındı. Sezon dışı dönemde düzenli olarak koçlardan haftada iki kez suni vajenle sperma alındı (Evans ve Maxwell, 1987). Aynı ayrı tüplere alınan sperma örnekleri bir tüpte birleştirilerek (pooling) spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra 4 eşit hacme ayrılarak kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CAPE (10, 50, 100 µg/ml) içeren sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra kryoprotektan olarak % 5 gliserol içeren sulandırıcı ile son sulandırma yapılacaktır. Tris stok solüsyonu için: Trisma base 3,63 g Sitrik asit 1,99 g Fruktoz 0,5 g Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak tris-sitrik asit-fruktoz solüsyonu hazırlandı. (Evans ve Maxwell, 1987) Gliserolizasyon sonrası spermalar 5°C'de 3 saat ekilibrasyondan sonra 5°C'de bulunan spermalar 0.25 ml'lik payetlere çekilip -110°C'de 15 dk. içerisinde donmaları sağlandı. İdentifikasyon amaçlı farklı renklerdeki payetler invitro değerlendirmelere kadar sıvı azot içerisinde (-196 °C) depolandı. Dondurulmuş spermalardan her grup için 6 adet olmak üzere 4 sulandırıcı için toplam 24 payet 37°C'lik su banyosunda 30 saniyede çözdürüldükten sonra spermatolojik parametreler, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı ise Comet assay yöntemiyle değerlendirildi.

Spermatozoa Motilitesi

Faz-kontrast mikroskopun 37°C'ye ayarlanmış ısıtma tablasına bir lam yerleştirildi. Lam üzerine izotonik solüsyonu ile toplu iğne başı büyüklüğünde sperma konularak sulandırılmış olan bu sperma üzerine lamel kapatıldı. Mikroskopun 100x objektifi ile görüntü bulunduktan sonra 200x ve 400x büyütmede muayene edildi. Motilitenin belirlenmesine yönelik olarak, en az üç mikroskop alanında değerlendirme yapılarak ve bir yönde düzgün

doğrusal hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara yüzde (%) oranı şeklinde motilite tespit edilerek kaydedildi (Hafez, 1987).

Anormal Spermatozoa Oranı

Sperma numunelerinde anormal spermatozoa oranı sıvı fizyasyon yöntemi ile belirlendi (Schafer ve Holzmann, 2000).

Hipo-ozmotik Eosin Boyama Test (HE-test)

Sperma numunelerinde ölü-canlı spermatozoa oranını ve hipo-ozmotik şişme testinin birlikte uygulandığı HE test kullanıldı. Ependorf tüpler içerisine su banyosunda 37°C'teki 100 mOsm'luk HOST solüsyonundan 1 ml alındı üzerine sperma numunesinden 10 µl eklendi daha sonra eosin boyası ilave edilip karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakılıp membranı sağlam ve canlı spermatozoonlar açısından değerlendirildi (Gündoğan vd., 2010).

DNA Hasarının Tespiti

Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanıldı. Comet assay olarak da adlandırılan bu yöntemde alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri prensibine göre değerlendirme yapıldı (Avdatek vd., 2018).

Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Ölçüm Erel'in (2004) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak gerçekleştirildi.

Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Ölçüm Erel'in (2005) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks ve Skewness test ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile, gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testinden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. P<0,05 düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Subjektif motilite ve anormal spermatozoon ile ilgili elde edilen bulgular Tablo 1'de verildi. Subjektif motilite yönünden 50 ve 100 µg/ml içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı (P<0.05) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 µg/ml içeren gruplardaki azalma önemli (P<0.05) bulunmuştur. HE-test sonucunda elde edilen veriler Tablo 2'de verildi. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış, H-/E- oranı yönünden kontrol grubuna göre 50 ve 100 µg/ml içeren gruplardaki artış ve H+/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml içeren gruptaki azalış ile beraber H-/E+ oranına göre kontrol grubuna göre tüm gruplardaki azalmanın önemli (P<0.05) olduğu belirlendi. DNA hasarı yönünden elde edilen bulgular Tablo 3'de sunuldu. Tail length, tail DNA ve tail moment açısından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu. Oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Tablo 4'de verildi. Spermatozoon TAS düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 100 µg/ml CAPE

The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester)

içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu.

Tablo 1. Çözüm sonrası spermatolojik parametreler ($\bar{X} \pm SEM$, n:6).

Gruplar	Motilite (%)	Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)
Kontrol	44,16±3,00 ^c	4,13±0,09 ^c	2,91±0,09 ^c	12,78±0,54 ^a	19,80±0,62 ^b
10 µg/ml	46,66±2,10 ^{bc}	4,83±0,11 ^a	4,31±0,16 ^a	13,95±0,47 ^a	23,10±0,49 ^a
50 µg/ml	51,66±1,66 ^{ab}	4,45±0,10 ^b	3,61±0,09 ^b	11,30±0,59 ^b	19,36±0,65 ^b
100 µg/ml	55,83±2,00 ^a	4,10±0,06 ^c	2,33±0,16 ^d	6,81±0,28 ^c	13,28±0,45 ^c

a-d: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0,05).

Tablo 2. Çözüm sonrası HE-test parametreleri ($\bar{X} \pm SEM$, n:6).

Gruplar	H+/E- (%)	H-/E- (%)	H+/E+ (%)	H-/E+ (%)
Kontrol	22,66±0,33 ^d	18,16±0,60 ^c	28,50±0,67 ^b	30,66±1,08 ^a
10 µg/ml	26,16±0,40 ^c	19,33±0,33 ^{bc}	32,00±0,36 ^a	22,33±0,42 ^b
50 µg/ml	30,83±0,70 ^b	19,83±0,47 ^b	31,00±1,21 ^a	18,33±1,17 ^c
100 µg/ml	32,33±0,49 ^a	24,00±0,36 ^a	26,00±0,25 ^c	17,83±0,47 ^c

a-d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî olarak önemlidir (P < 0,05).

Tablo 3. Çözüm sonrası DNA Hasarları ($\bar{X} \pm SEM$, n:6).

Gruplar	Tail Length (µm/s)	Tail DNA (%)	Tail Moment (µm/s)
Kontrol	21,27±0,50 ^b	63,91±1,08 ^b	16,25±0,18 ^b
10 µg/ml	31,05±0,52 ^a	67,90±0,92 ^a	23,28±0,40 ^a
50 µg/ml	31,39±0,45 ^a	69,85±1,02 ^a	23,88±0,70 ^a
100 µg/ml	17,93±0,26 ^c	38,94±0,65 ^c	13,34±0,56 ^c

a-c: Sütun içerisinde farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0,05).

Tablo 4. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ($\bar{X} \pm SEM$, n:6).

Gruplar	TAS (mmolTrolox Equiv./L)	TOS (µmol hidrojenperoksit-Equiv./L)
Kontrol	2,66±0,84 ^c	27,72±0,35 ^{ab}
10 µg/ml	3,09±0,07 ^b	28,16±1,84 ^{ab}
50 µg/ml	2,55±0,10 ^c	29,08±0,41 ^a
100 µg/ml	4,47±0,15 ^a	25,75±0,49 ^b

a-c: Herbir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0,05).

TARTIŞMA

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, spermatolojik özellikleri ve fertilitiyi olumsuz olarak etkiler. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma, taze spermaya göre peroksidasyona daha duyarlıdır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebep olarak spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonunu göstermektedir. Bu nedenle koç spermasının dondurulmasında, çözdürme

sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden,

sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır. Çalışmamızda subjektif motilite yönünden 50 ve 100 µg/ml içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı (P<0.05) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 µg/ml CAPE içeren gruplardaki azalma önemli (P<0.05) bulunmuştur. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış önemli (P<0,05) olduğu belirlendi. Tail lenght, tail DNA ve tail moment açısından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu. Spermatozoon TAS düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 100 µg/ml CAPE içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli (P<0,05) bulundu.

Soleimanzadeh vd. (2020), tarafından mandalarda yapılan bir çalışmada sperma sulandırıcısına ilave edilen 100 µM Kafeik Asit ilavesinin çözüm sonu spermatozoon motilitesi, oksidatif stres parametreleri ile DNA hasarı üzerine olumlu katkı sağladığını ortaya koymuşlardır. Namula vd. (2018), tarafından yapılan bir çalışmada, domuz spermasının dondurulması sırasında sperma sulandırıcısına 100 µM Kafeik Asit eklenmesinin motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü dahil olmak üzere bazı spermatolojik parametreleri iyileştirdiği bildirilmiştir. Ayla vd. (2018), motilitesi ve morfolojisi bozuk insan spermatozoon örneklerini farklı konsantrasyonlarda CAPE ile 36 °C'de 2 saat inkübasyona tabii tutup daha sonra seminal plazma MDA seviyesi ile spermatozoon DNA'sını değerlendirdikleri çalışmalarında CAPE ile ön inkübasyonunun oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruma sağladığını bildirmektedirler. Okutan vd. (2005), diyabet oluşturarak ratlarda yaptıkları çalışmalarında, diabetes mellitus'un kalp dokusunda oksidatif stresi arttırdığını ve CAPE'nin antioksidan

özelliği sayesinde oksidatif stresi iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mercantepe vd. (2018), ratları sispilatin toksisitesine maruz bıraktıkları ve koruyucu etkilerinden yaralanmak için farklı antioksidanlar kullandıkları çalışmalarında intraperitoneal 10 µmol/kg/gün CAPE verdikleri grubun testis dokusu üzerinde meydana gelen hasarı geri çevirdiğini bildirmektedirler. Erboğa vd. (2016), ratlarda kadmiyum toksisitesi oluşturdukları çalışmalarında 30 gün boyunca 10 µmol/kg/gün dozunda CAPE verilen grubun kadmiyumun neden olduğu testis hasarı, apoptoz ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirmektedirler. Abdallah vd. (2012), ratlarda bir pestisid olan cyhalothrin vererek üreme organları ve fertilité üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında CAPE'in cyhalothrin kaynaklı oluşan oksidatif stersi ve testis toksisitesini azalttığını ortaya koymuşlardır. Özyurt vd. (2006), sigara dumanına 60 gün boyunca maruz bıraktığı ratlarda periton içi CAPE uygulanmış ve testiküler NO, SOD, GSH-Px, katalaz ve MDA çalışılmıştır. Sigara içen grupta CAT ve SOD aktivitelerinin anlamlı olarak yüksek ve GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğu, CAPE uygulanan grupta ise bu etkilerin normalize edildiği görülmüş. Sigara içen grupta testis dokusundaki artmış MDA ve NO seviyeleri CAPE uygulamasıyla tersine çevrilerek, CAPE'nin sigaraya bağlı hasar üzerindeki koruyucu rolünü belirlemişlerdir. Armağan vd. (2008), ratların testislerinde kemoterapötik ajan olan Metotreksat (MTX), uygulamasıyla ROS üretiminde ve oksidatif streste herhangi bir değişiklik olup olmadığını ve CAPE tedavisinin bu anormal durumu durdurup durdurmadığını araştırdıkları çalışmalarında ortalama vücut ve testis ağırlığı, antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon parametreleri değerlendirilmişler. Lipid peroksidasyon seviyesi ve SOD aktiviteleri MTX grubunda anlamlı olarak daha yüksek iken CAPE uygulamasından sonra bunların azaldığını belirlemişler. Sonuç

olarak, MTX tedavisi ile CAPE uygulamasının testislerde MTX kaynaklı oksidatif hasar üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlar. Huyut vd. (2020), kemoterapötik bir ajan olan doxorubicin (DOX) ile ratlarda testis hasarı oluşturarak curcuminin ve CAPE'in koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında her iki antioksidanın da oksidatif stresi azaltarak testislerde meydana toksisiteyi azalttığını belirlemişlerdir. Yılmaz vd. (2008), ratlara radyografik kontrast madde uygulayarak testislerinde oksidatif stres kaynaklı toksisite oluşturdukları çalışmalarında antioksidan özelliklerinden yararlanmak amacıyla erdostin ve CAPE tedavisi uygulamışlar CAPE'in erdostine göre oksidatif hasarı ve dolayısıyla testis toksisitesini baskıladığını bildirmektedirler. Ceylan vd. (2020), ratlarda propolisin etken maddelerinden olan CAPE'in sisplatinine bağlı testis hasarını ortadan kaldırmadaki koruyucu etkisinin araştırdıkları çalışmalarında CAPE uygulanan grubun diğer gruplara göre oksidatif stresi ve spermatozoon DNA hasarını azaltarak CAPE'in koruyucu ve düzeltici bir etkisi olduğunu bildirmektedirler. Yaptığımız literatür taramalarında koç spermasının uzun süre saklanmasında sulandırıcıya antioksidan özelliğinden yararlanmak amacıyla ilave edilen bal arısı propolis ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşeni olan CAPE'in çalışıldığı herhangi bir literatüre rastlanmadı.

Çözüm sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarında elde edilen veriler yukarıda bahsedilen bazı çalışmalar ile paralellik gösterirken bazı çalışmalar ile de farklılıklar göstermektedir. Gözlenen bu farklılıklar ırk, sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktarı ve oranları, özellikle sperma sulandırıcısına katılan antioksidanın farklı konsantrasyonda olması ve spermanın değerlendirilmesinde kullanılan teknikler gibi faktörlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın dondurularak saklanmasında spermaya katılan farklı dozlardaki CAPE'in 100 µg/ml grubunun spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, H-E test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Ayrıca yapılacak araştırmalarda in-vitro muayene parametrelerinin in-vitro/vivo fertilitate parametreleri ile de desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

AÇIKLAMALAR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından 18. KARIYER.133 nolu proje ile desteklenmiştir.

Etik onay: Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel etik Kurulu tarafından 13.03.2018 tarihli toplantıda (AKÜHADYEK) -35-18 referans numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur. Yazarlar, bildirilen araştırmanın tarafsızlığına zarar verecek şekilde algılanabilecek herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Fetoui, H, Zribi, N., Fakhfakh, F, Keskes, L. (2012).** Protective role of caffeic acid on lambda cyhalothrin-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Toxicol Ind Health*, 28, 639-47.
- Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., Velazquez, C. (2015).** Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of Giardia lamblia trophozoites. *Planta Med*, 81 (9), 742-747.
- Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yılmaz, H.R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H.R., Soyupek, S., Cam, H., Serel, T.A. (2008).** Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol*, 27, 547-52.
- Avdatek, F., Yeni, D., İnanç, M.E., et al. (2018).** Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. *Andrologia*, 50:e12975.

- Ayla, Ş., Tunalı, G., Bilgiç, B.E., Sofuoğlu, K., Özdemir, A.A., Tanrıverdi, G., Özdemir, S., Soner, B.C., Öztürk, B., Karahüseyinoğlu, S., Aslan, E.G., Seçkin I. (2018). Antioxidant activity of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. *Acta Histochemica*, 120(2), 117-121.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Marekov, N., (1987). A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch*, 42, 147-151.
- Celli, N., Dragani, L.K., Murzilli, S., Pagliani, T., Poggi, A., (2007). In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. *J Agric Food Chem*, 55, 3398–3407.
- Ceylan, T., Kaymak, E., Cantürk, F., Yakan, B. (2020). Research on the protective effect of caffeic acid phenethyl ester on testicular damage caused by cisplatin. *Turk J Med Sci*. 50, 2032-2039.
- Chen, H.C., Chen, J.H., Chang, C., Shieh, C.J. (2011). Optimization of ultrasound accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, 18, 455–459.
- Erboga, M., Kanter, M., Aktas, C., Donmez, Y.B., Erboga, Z.F., Aktas, E., Gurel A. (2016). Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, 171, 176–184.
- Erel, Ö. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 37(2), 112-119.
- Erel, Ö. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38(12), 1103-1111.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci*, 122, 200-207.
- Hafez E.S.E. (1987). Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Editor: HAFEZ ESE. *Reproduction in Farm animals*, 5th edition Lea-Febriger, Philadelphia, page 571-600.
- Huyut, Z., Alp, H.H., Yaman, T., Keleş, Ö.F., Yener, Z., Türkan, F., Ayengin, K. (2020). Comparison of the protective effects of curcumin and caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced testicular toxicity. *Andrologia*, 00:e13919.
- Koltuksuz, U., Irmak, M.K., Karaman, A., Uz, E., Var, A., Ozyurt, H., Akyol, O., (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol. Res*, 28 (6), 360–363.
- Mercantep, T., Unal, D., Tümkaya, L., Yazıcı, Z.A. (2018). Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med*, 15(4), 3404-3412.
- Namula, M., Hirata, M., Wittayararat, F., Tanihara, N., Thi Nguyen, T., Hirano, M., Nii, T. (2018). Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Reprod. Domest. Anim*. 53, 1600–1604.
- Ogeturk, M., Kus, I., Colakoglu, N., Zararsiz, I., Ilhan, N., Sarsilmaz, M. (2005). Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J. Ethnopharmacol*. 97 (2), 273–280.
- Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R., Uz, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, 38, 191–196.
- Ozyurt, H., Pekmez, H., Parlaktas, B.S., Kus, I., Ozyurt, B., Sarsilmaz, M. (2006). Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl*, 8, 189-93.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal. B.B., (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49, 1603-1616.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16, 91-98.
- Russo, A., Longo, R., Vanella, A., (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73(1), S21-29.
- Schafer, S., Holzmänn, A. (2000). The use of transmigrator and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*. 59, 201-211.
- Soleimanzadeh, A., Talavi, N., Yourdshahi, V.S., Bucak, M.N. (2020). Caffeic acid improves microscopic sperm parameters and antioxidant status of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen following freeze-thawing process. *Cryobiology*. 95, 29-35.
- Song, J.J., Lim, H.W., Kim, K., Kim, K.M., Cho, S., Chae, S.W. (2012). Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 76 (5), 675–679.
- Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z., Abdel-Naim, A.B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*, 65 (8), 699–709.
- Wang X., Stavchansky S., Kerwin S. M., Bowman P. D., (2010). Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *Eur J Pharmacol*, 635, 16-22.
- Widjaja A, Yeh TH, Ju YH, (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *J Chin Inst Chem Eng*, 39, 413-418.
- Yılmaz, H.R., Uz, E., Yeşildağ, A., Özden, A., Sırmalı, R., Ağackiran, Y., Vural, H. (2008). Effects of caffeic acid phenethyl ester and erdosteine on radiocontrast media-induced oxidative stress and histopathological changes in rat testicular tissue. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 1(2), 78-83.

Kidney tissue selenium levels of *Toxocara Canis* infected mice given *Nigella Sativa*

ABSTRACT

Nigella sativa (NS) has a protective effect on cellular damage caused by oxidative stress. Selenium has an antioxidative effect. *Toxocara canis* is one of the nematodes causing visceral larva migrans. Men infected with this parasite ingesting an embryonic egg. It is more common in children between 1-4 years than adults. From the ingested embryonic egg, the larvae released in the small intestine and they migrate to so many organs such as liver, spleen, kidney, lung, and brain, retina of the eye, pancreas and causing lesions. In particular, it is known to cause intense damage to kidney tissue. In this study mice with *Toxocara canis* infection were administered *Nigella sativa* in prophylactic and treatment doses (100 and 200 mg/kg body weight) and selenium levels were determined in their kidney tissues. In the healthy control group, kidney selenium levels were 980,46±236,68 ng/g and in mice infected with *Toxocara canis* 1240,15±315,77 ng/g. Kidney tissue Se levels of mice given NS in two different doses for treatment (Treated N100, Treated N200) and prophylaxis (Prophylactic N100 and ProphylacticN200) respectively are 1297,95±354,37; 1361,29±410,46 ng/g; 1148,55±240,28 ng/g and 1465,81±450,25 ng/g. Kidney tissue selenium levels were high in both treatment and prophylaxis dose NS given mice. In conclusion, *Nigella sativa* can cause increases in kidney tissue selenium levels depends on given doses.

Keywords: *Nigella sativa*, selenium, oxidative stress, kidney, *Toxocara canis*

INTRODUCTION

Despite the advancement and use of modern medicine, the demand for complementary and alternative medical practices is increasing day by day (Ekor, 2014). *Nigella sativa* (NS) is an annual herbaceous plant that belongs to the Ranunculaceae family, which grows naturally in the Mediterranean, Eastern European, Southern and South-western Asian countries (Cheikh-Rouhou et al., 2007). The plant, also known as nigella or fennel flower, is characterized by its black seeds and is known to be traditionally used against a variety of diseases (Jakaria et al., 2018; Meral et al., 2001). *Nigella sativa* is known to act as a major antioxidant and anti-inflammatory agent. It has also been reported to have a wide range of effects such as anti-diabetic, anti-carcinogenic, immunomodulator and bronchodilator effects (Tavakkoli et al., 2017). Proper functioning of the immune system depends on the presence of trace elements that are essential to be taken with nutrients like antioxidants and cofactors (Lukác and Massányi, 2007). Selenium (Se) is a trace element that affects both the natural and acquired immune responses. Selenium acts as an antioxidant system that can prevent tissue and cell damage and can affect enzyme activity in different organs such as the kidneys (Huang et al., 2012).

How to cite this article

Sayiner, S., Altaş, MG., Camkerten, G., Şehirli, AÖ., Paksoy, N., Balkan., BM, Soran GŞ (2021). Kidney tissue selenium levels of *Toxocara Canis* infected mice given *Nigella Sativa*. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 278-283. <https://doi.org/10.31797/vetbio.977962>

Research Article

Serkan Sayiner^{1a}
Mehtap Gül Altaş^{2b}
Güzin Camkerten^{3c}
Ahmet Özer Şehirli^{4d}
Nilgün Paksoy^{5e}
Burcu Menekşe Balkan^{6f}
Gülten Senocak Soran^{7g}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Sanliurfa, Turkey.

³Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey.

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁵Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Sanliurfa, Turkey.

⁶Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey

⁷Department of Biology, Faculty of Art and Science, Harran University, Sanliurfa, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-3297-5369](https://orcid.org/0000-0002-3297-5369)

^b[0000-0002-0120-9266](https://orcid.org/0000-0002-0120-9266)

^c[0000-0003-2732-9490](https://orcid.org/0000-0003-2732-9490)

^d[0000-0002-5175-9290](https://orcid.org/0000-0002-5175-9290)

^e[0000-0001-6231-5524](https://orcid.org/0000-0001-6231-5524)

^f[0000-0002-0206-6455](https://orcid.org/0000-0002-0206-6455)

^g[0000-0001-8273-1904](https://orcid.org/0000-0001-8273-1904)

Correspondence

Serkan SAYINER

cemayvazoglu@hotmail.com

Article info

Submission: 10-09-2021

Accepted: 22-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



Selenium can be stored in many organs and is found in its highest concentrations in the kidney. Thus, the kidney is the most sensitive indicator of the animal's selenium status, and selenium concentrations in this organ can provide valuable diagnostic information (Combs Jr, 2015; Shamberger, 1983).

Toxocara canis is a worldwide-distributed nematode that belongs to the Ascaridae family, which can cause various forms of the disease in its hosts. Soils in both rural and urban areas are known to be contaminated by eggs spread by dogs or foxes (Kleine et al., 2017). The parasite completes its life cycle in dogs. Human beings become infected by accidental exposure of parasites as hosts. After the parasite egg is ingested, the larvae penetrate the intestinal wall and then penetrate various tissues, including the kidney. The dominant clinical manifestation associated with *T.canis* is the visceral larva migrans (VLM) syndrome, a multi-systemic disease. Oxidative damage is known to play a role in the pathophysiology of *T.canis* infection, which is a common parasitic infection (Yarsan et al., 2003).

The question of to what extent the changes in selenium intake with nutrients and organ intake can affect the parasitic infections and concomitant immune response is important. Literature information about the effect of Toxocariasis and NS administration on tissue and serum selenium concentration is lacking. Therefore, it was aimed to evaluate the role of selenium, which has endogenous antioxidant and immunomodulatory properties in *T.canis*-infected mice, and the effect of prophylactic and therapeutic NS administration on kidney selenium levels.

MATERIAL and METHOD

Animals

A total of 50 healthy adult male BALB/c mice weighing 25 ± 2 g was obtained from the Department of Biology, Istanbul University Faculty of Science. The animals were kept in a

room at a constant temperature of $+22\pm 2^\circ\text{C}$ under 12 hours dark/light cycle conditions. The mice were fed with water and standard pellets ad libitum. The mice were accustomed to laboratory conditions two weeks before the experiment. The animal protocols were pre-approved by the Harran University Animal Experiments Ethics Committee, Sanliurfa, Turkey, before the commencement of the experiment.

Collection and preparation of parasite eggs

The female adult *T.canis* were collected from naturally infected puppies from a shelter in Sanliurfa. The female worms of the obtained *T.canis* were washed in physiological saline, and the eggs were extracted from the vagina and distal third of the uterus. Then, the development of the eggs was realized in 20 days with continuous ventilation at 28°C (Bowman et al., 1987). The eggs were diluted with 10% gum arabic suspension to achieve 500 embryonated eggs in 1 ml of suspension (Musa et al., 2011).

Plant material

NS seeds were purchased from a local herbal shop in Sanliurfa Turkey, and two different doses of the extract were formulated (100 and 200 mg/kg body weight NS) (Musa et al., 2011). Firstly, the seeds were cleaned, washed and pulverized in an electrical grinder. It was waited on methanol for 24 hours and was filtered. Its extracted matter was obtained with using a rotary evaporator and dried by lyophilisation and suspended with 10% gum arabic solution.

Experimental groups

Fifty albino mice, weighing 18-25 g, were used. Mice were divided into six experimental groups; 7 mice in control and 43 in experimental groups (Table 1). The treatment was given for seven consecutive days to control and experimental groups. At the beginning and the end of the experiment, blood smears were used to determine *T.canis* infection.

Biochemical analyses

At the end of 7 days, the animals were decapitated, and kidney samples were collected and stored at -70 °C until the time of analysis. Kidney samples were analyzed for selenium by wet ashing and fluorometric detection of the 2,3-diaminophthalene derivative (Koh and Benson, 1983).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego; CA; USA). All data were expressed as mean \pm standard deviation (Mean \pm SD). The groups were compared with the analysis of variance (ANOVA) and then post hoc Tukey's multi-comparison tests. Significance levels were considered as $P < 0.05$.

Table 1. Experimental groups and treatments

Groups	Treatments
Control	Healthy mice group, 1 ml 10% gum Arabic suspension.
<i>T.canis</i> infected	500 embryonic eggs of <i>T.canis</i> were injected orally using an oesophageal catheter.
Treated N100	500 embryonic eggs of <i>T.canis</i> were injected orally using an oesophageal catheter and then during 7 days 100mg/kg NS was given.
Treated N200	500 embryonic eggs of <i>T.canis</i> were injected orally using an oesophageal catheter and then during 7 days 200mg/kg NS was given.
Prophylactic N100	During 7 days, 100mg/kg NS was given at first then 500 embryonic eggs of <i>T.canis</i> were injected orally using an oesophageal catheter. The day after given <i>T.canis</i> eggs, NS was given during 7days.
Prophylactic N200	During 7 days, 200mg/kg NS was given at first then 500 embryonic eggs of <i>T.canis</i> were injected orally using an oesophageal catheter. The day after given <i>T.canis</i> eggs, NS was given during 7days.

Table 2: Se levels of kidney tissues in all groups (ng/g).

Groups	n	Mean \pm SD
Control	7	980,46\pm236,68
<i>T.canis</i> infected	9	1240,15\pm315,77
Treated N100	9	1297,95\pm354,37
Treated N200	9	1361,29\pm410,46
Prophylactic N100	6	1148,55\pm240,28
Prophylactic N200	10	1465,81\pm450,25

RESULTS

In control group which mice were healthy, kidney selenium levels were 980,46 \pm 236,68 ng/g and in mice infected with *T.canis* 1240,15 \pm 315,77 ng/g. Kidney tissue Se levels of mice given NS in 100mg/kg doses for treatment (Treated N100) are 1297,95 \pm 354,37 and

200mg/kg doses for treatment (Treated N200) are 1361,29 \pm 410,46 ng/g. Kidney tissue selenium levels for prophylactic groups were founded 1148,55 \pm 240,28 ng/g in Prophylactic N100 group and 1465,81 \pm 450,25 ng/g Prophylactic N200 group (Table 2).

DISCUSSION

Toxocariasis is one of the most common zoonotic infections in humans with a chronic course. Long-term use of anti-parasitic drugs may cause resistance to these drugs (Geerts and Gryseels, 2001; Kappagoda et al., 2011). Today, natural products with antioxidant and anti-inflammatory effects are recommended to replace antiparasitic drugs or co-use of them, including those against *Toxocara* infections. Besides, selenium intake with foods and tissue selenium content may be effective on immune system. In the present study, the efficacy of NS on treatment and prophylactic doses, which has been reported to have antioxidant activity on kidney selenium levels, was evaluated in experimentally infected mice with *T.canis*.

In a study, 100 and 200 mg/kg NS administration was shown to decrease the total *T.canis* larvae burden and the inflammation degree (Musa et al., 2011). In another study, the effectiveness of NS treatment on serum cytokine levels was demonstrated and its use in treatment was suggested (El-Refai et al., 2017). The anti-Toxocara effects of NS may depend on many factors. NS has been suggested to have a direct lethal effect on Toxocara larvae in vivo (El-Refai et al., 2017). In addition, NS has been found to cause vacuolisation and irregularity in the adult parasite cuticle (Shalaby and El-Moghazy, 2013). *Nigella sativa* is thought to play a role against the changes caused by parasites due to the stimulating effect on the immune system and some degree of antioxidant effect in parasitic infections (Mahmoud et al., 2002; Majdalawieh and Fayyad, 2015). In addition, NS has anti-inflammatory properties by inhibiting the formation of eicosanoids, the inflammatory promoters (Darakhshan et al., 2015). In our study, the effect of NS on selenium levels, which is known to have antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory effects, which is an important component of the antioxidant system in the kidneys, was investigated in mice infected with *T.canis*.

Kidney tissue has the highest selenium concentration, and normal selenium levels are greater than 1000 ng/g. A decrease of about half indicates marginal selenium deficiency (Shamberger, 1983). Antioxidants are substances that function to protect cells from damage caused by unstable free radicals and reactive oxygen species (ROS) (Lobo et al., 2010). NS has been used in the Middle East for centuries to treat disease processes. Various studies with NS, which is known to be a free radical scavenger, have shown its hypotensive, analgesic, diuretic, choleric, antidiabetic, anti-inflammatory, antiviral, anthelmintic, antibacterial, antitumoral, antihistamine, immunomodulatory, antioxidant and hepatoprotective effects (Tavakkoli et al., 2017).

In in vitro studies, NS has been found to reduce lipid peroxidation, protein oxidation and has shown a protective effect in various cell types (Tülüce et al., 2009; Khaldi et al., 2018). Despite these high numbers of studies with NS, its effects on endogenous selenium are not fully known. Unlike NS, selenium is found in almost all human tissues and is classified as a trace element. Selenium has the ability to change cells by acting as an antioxidant, regulating the redox status and immunomodulators (Tapiero et al., 2003; Tinggi, 2008). Selenium deficiency inhibits both cellular and humoral responses (Sun et al., 2018). Studies have shown that the immune system is negatively affected by different types of parasitic diseases due to selenium deficiency (Pilarczyk et al., 2012). However, the effect of NS use on endogenous selenium in *T.canis* infected animals has not been investigated. In our study, it was found that kidney tissue selenium concentration increased in all experimental groups, but these increases were not statistically significant compared to the control group. NS may increase Se accumulation in kidney tissues in two different ways; first one is Se is involved in NS extract (Naz, 2011) and the second one NS increases Se intake to tissues. To reveal these further studies should be carried

out to reveal. *T.canis* is known to induce oxidative metabolism (Mahadappa and Dey, 2018). *Nigella sativa* has a positive antioxidative effect (Darakhshan et al., 2015). Other increases in Treated N200 and Prophylactic N200 groups may be related to the antioxidative effect of NS depending on the given doses.

CONCLUSION

In this study, an attempt was made to evaluate the effect of selenium intake on *T.canis* infected mice. In conclusion, it is thought that NS may cause an increase in selenium concentration in kidney tissue depending on the administered doses, which may be protective against *T.canis* infections by contributing to the antioxidant system or used as a supportive factor together with treatment.

ACKNOWLEDGMENT

This study is presented at scientific meeting. (International Symposium on Selenium in Health and Disease, 12-13 October 2006, Ankara)

Ethical approval: Ethical approval of the present study was acquired from the Harran University Animal Experiments Ethics Committee, Sanliurfa, Turkey, before the commencement of the experiment (11.07.2005).

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

KAYNAKLAR

- Bowman, D.D., Mika-Grieve, M., Grieve, R.B. (1987).** Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36,75–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.75>
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blekcer, C., Deroanne, C., Attia, H. (2007).** *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*, 101, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.022>
- Combs, Jr G.F. (2015).** Biomarkers of selenium status. *Nutrients*, 7, 2209–2236. <https://doi.org/10.3390/nu7042209>

- Darakhshan, S., Bidmeshki Pour, A., Hosseinzadeh Colagar, A., Sisakhtnezhad, S. (2015).** Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*, 95–96, 138–158. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011>
- Ekor, M. (2014).** The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4 JAN,1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- El-Refai, S.A., El-Aswad, B.E.D.W., Mahmoud, S.F. (2017).** Parasitological, pathological and immunological effects of *Nigella sativa* oil in experimentally *Toxocara canis* infected mice. *Tropical Biomedicine*, 34, 781–794.
- Geerts, S., Gryseels, B. (2001).** Anthelmintic resistance in human helminths: a review. *Tropical Medicine & International Health*, 6, 915–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00774.x>
- Huang, Z., Rose, A.H., Hoffmann, P.R. (2012).** The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16, 705–743. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>
- Jakaria, M., Cho, D.Y., Haque, M.E., Karthivashan, G., Kim, I.S., Ganesan, P., Choi, D.K. (2018).** Neuropharmacological potential and delivery prospects of thymoquinone for neurological disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 4, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2018/1209801>
- Kappagoda, S., Singh, U., Blackburn, B.G. (2011).** Antiparasitic therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 86 (6), 561–583. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0203>
- Khaldi, T., Chekchaki, N., Boumendjel, M., Taibi, F., Abdellaoui, M., Boumendjel, A. (2018).** Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergologia et Immunopathologia*, 46, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>
- Kleine, A., Springer, A., Strube, C. (2017).** Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. *Parasites and Vectors*, 10, 6–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2193-6>
- Koh, T.S., Benson, T.H. (1983).** Critical re-appraisal of fluorometric method for determination of selenium in biological materials. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 66, 918–926.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lukác, N., Massányi, P. (2007).** Effects of trace elements on the immune system. *Epidemiologie, mikrobiologie, immunologie*, 56, 3–9.

- Mahadappa, P., Dey, S. (2018).** Effects of *Toxocara canis* Infection and Albendazole Treatment on Oxidative/Nitrosative Stress and Trace Element Status in Dogs. *International Journal of Livestock Research*, 8, 144–153. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20170720111145>
- Mahmoud, M.R., El-Abhar, H.S., Saleh, S. (2002).** The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00310-5](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00310-5)
- Majdalawieh, A.F., Fayyad, M.W. (2015).** Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *International Immunopharmacology*, 28, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.023>
- Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. (2001).** Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Anti-Oxidant Defence System and Liver Damage in Experimentally-Induced Diabetic Rabbits. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 48, 593–599. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00393.x>
- Musa, D., Senocak, G., Borazan, G., Altaş, M., Ozgonul, A., Sogut, O., Güldür, M.E. (2011).** Effects of *Nigella sativa* and albendazole alone and in combination in *Toxocara canis* infected mice. *Journal of Pakistan Medical Association*, 61, 866–870.
- Naz, H. (2011).** *Nigella sativa*: the miraculous herb. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 44, 44–48.
- Pilarczyk, B., Jankowiak, D., Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk, R., Sablik, P., Drozd, R., Tylkowska, A., Skólmowska, M. (2012).** Selenium concentration and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum of cows at different stages of lactation. *Biological Trace Element Research*, 147, 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9271-y>
- Shalaby, H.A., El-Moghazy, F.M. (2013).** In vitro effect of *Nigella sativa* oil on adult *Toxocara vitulorum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 1557–1562. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.1557.1562>
- Shamberger, R.J. (1983).** *Biochemistry of Selenium*. New York: Plenum Publishing.
- Sun, Z., Xu, Z., Wang, D., Yao, H., Li, S. (2018).** Selenium deficiency inhibits differentiation and immune function and imbalances the Th1/Th2 of dendritic cells. *Metallomics*, 10, 759–767. <https://doi.org/10.1039/c8mt00039e>
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003).** The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 134–144. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(03\)00035-0](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00035-0)
- Tavakkoli, A., Ahmadi, A., Razavi, B.M., Hosseinzadeh H. (2017).** Black Seed (*Nigella Sativa*) and its Constituent Thymoquinone as an Antidote or a Protective Agent Against Natural or Chemical Toxicities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 2–23.
- Tinggi, U. (2008).** Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13, 102–108. <https://doi.org/10.1007/s12199-007-0019-4>
- Tülüce, Y., Özkol, H., Söğüt, B., Çelik, I. (2009).** Effects of *Nigella sativa* L. on lipid peroxidation and reduced glutathione levels in erythrocytes of broiler chickens. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 1, 95–99.
- Yarsan, E., Altinsaat, Ç., Ayçiçek, H., Şahindokuyucu, F., Kalkan, F. (2003).** Effects of Albendazole Treatment on Haematological and Biochemical Parameters in Healthy and *Toxocara canis* Infected Mice. *Turkish Journal Of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 1057–1063.

Fungisit tebukonazolün tatlı su midyelerine (*Unio mancus*) toksik etkilerinin çoklu biyobelirteçlerle incelenmesi

Investigation of toxic effects of fungicide tebuconazole on freshwater mussels (*Unio mancus*) with multiple biomarkers

ÖZET

Triazol fungusitler, geniş spektrumlu, steroidal olmayan antiöstrojenler ve çeşitli endüstriyel uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Toprak, su gibi çevresel ortamlarda ve canlı organizmaların dokularında bu fungusitlerin kalıntılarına rastlanmaktadır. Giderek artan toksisite raporları, triazol fungusitlerin çevre ve halk sağlığı açısından endişe verici kirleticiler olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, triazol grubu fungusitlerden en yaygın kullanılan türlerinden biri olan tebukonazolün (TEB) hedef dışı organizmalar olan tatlı su midyeleri (*Unio mancus*) üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada, 96 saat boyunca dört TEB konsantrasyonuna (1.5, 15, 150 ve 1500 µg AI L⁻¹) maruz bırakılan midyelerin solungaç ve sindirim bezlerinde çeşitli oksidatif stres parametreleri [toplam antioksidan konsantrasyonu (TAC), toplam oksidan konsantrasyonu (TOC), oksidatif stres indeksi (OSI), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA)], antioksidan enzimler [(süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR)] ve biyotransformasyon enzimlerinden karboksil esteraz (CaE) aktivitesi değerlendirilmiştir. TEB'e maruz kalmanın hem solungaçta hem de sindirim bezinde kontrole göre önemli oranda TAC, OSI, MDA seviyelerini arttırdığı, TOC ve GSH düzeylerini düşürdüğü, SOD, GPx, GST aktivitelerini arttırdığı, GR ve CaE'yi ise inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, TEB'in *U. mancus*'da önemli toksik etkiler oluşturduğu ve tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midyelerin TEB'e maruz kalma tehdidi altında olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteçler, oksidatif stres, tatlısu midyeleri, tebukonazol

ABSTRACT

Triazole fungicides are widely used as broad-spectrum, non-steroidal antiestrogens and for various industrial applications. Residues of these fungicides are found in environments such as soil and water, and in the tissues of living organisms. Increasing toxicity reports have led to the emergence of triazole fungicides as pollutants of environmental and public health concern. In this study, the toxic effects of tebuconazole (TEB), one of the most widely used triazole fungicides, on freshwater mussels (*Unio mancus*), which are non-target organisms, were investigated. In the study, various oxidative stress parameters [total antioxidant concentration (TAC), total oxidant concentration (TOC), oxidative stress index (OSI), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA)], antioxidant enzymes [(superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR)] and carboxylesterase (CaE) activity from biotransformation enzymes was evaluated in the gill and digestive glands of mussels exposed to four TEB concentrations (1.5, 15, 150 and 1500 µg AI L⁻¹) for 96 hours. It was observed that TEB exposure significantly increased TAC, OSI, MDA levels, decreased TOC and GSH levels, increased SOD, GPx, GST activities, and inhibited GR and CaE activities in both the gill and digestive gland compared to the control. As a result, it can be said that TEB has significant toxic effects on *U. mancus* and mussels living in freshwater ecosystems may be under the threat of TEB exposure.

Keywords: Biomarkers, oxidative stress, freshwater mussels, tebuconazole

How to cite this article

Uçkun M. (2021). Investigation of toxic effects of fungicide tebuconazole on freshwater mussels (*Unio mancus*) with multiple biomarkers. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 284-297. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1014522>

Research Article

Miraç Uçkun

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey

ORCID-

[0000-0002-9018-8515](https://orcid.org/0000-0002-9018-8515)

Correspondence

Miraç UÇKUN

m.uckun@adiyaman.edu.tr

Article info

Submission: 25-10-2021

Accepted: 29-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution

4.0 International License

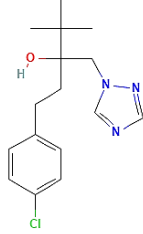


İRİŞ

GAzoller, geniş spektrumlu antifungal aktivitesi ve yüksek stabilitesi nedeniyle mantar enfeksiyonlarına karşı bitki koruması, insan mikozunun tedavisi ve veterinerlik tıbbı için yaygın olarak kullanılan antimikotik ajanlardır (Bhagat vd., 2021). İlaçların yanı sıra azol bileşikleri uçaklarda aşındırıcı inhibitörler (McNeill ve Cancilla, 2009), çamaşır tozu (Janna vd., 2011) ve şampuan, krem, köpük, diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır (Allen vd., 2015). Azoller, dünya çapında yıllık 300,000 ton civarında olan

fungisit kullanımının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (De vd., 2014). Çevrede yaygın olarak bulunması nedeniyle, suda yaşayan organizmalar üzerindeki zararlı etkileri konusunda endişeler vardır (Nong vd., 2021). Azol bileşikleri güçlü bakterisidal aktiviteye sahiptir ve biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir. Azol, hücre zarı bütünlüğü için gerekli olan lanosterolü ergosterole dönüştüren bir sitokrom P450 (CYP) enzimi olan lanosterol 14- α -demetilazı (CYP51A1) inhibe eder. Dolayısıyla hücre zarının kaybı ve inhibisyonu, azolün antifungal doğasının arkasındaki ana mekanizmalardan biridir (García-Valcárcel ve Tadeo, 2012).

Tablo 1. Ticari pestisit formülasyonu ve etken maddenin fiziko-kimyasal özellikleri,^a

Pestisit	
	Orius 25 EW
Ticari konsantrasyon	250 g Al L ⁻¹
Etken madde	Tebukonazol
Etken maddenin fiziko-kimyasal özellikleri	
Yapısal formüller	
Etken madde grubu	Triazol
Pestisit tipi	Fungisit
Toksikolojik sınıf	III
Moleküler ağırlık (g/mol)	307.8
Lipofilite (log <i>K_{ow}</i>)	3.7 (20°C ve pH 7.0)
Toprak afinitesi (log <i>K_{oc}</i>)	2.96 – 3.10
Sudaki çözünürlük (mg/L)	32 (20°C)
GUS potansiyel sızma indeksi	1.86
Sudaki fotoliz yarılanma süresi (DT₅₀, gün)^b	Stabil
Sudaki hidroliz yarılanma süresi (DT₅₀, gün)	Stabil
Topraktaki kalıcılık süresi (DT₅₀, gün, aerobik koşullarda)^c	~800
Yüzey sularındaki konsantrasyon aralığı (µg L⁻¹)	9.1 µg L ⁻¹ ~ 200 µg L ⁻¹

^a Kaynaklar: PPDB, 2021; EFSA, 2008; Nikolaou vd. 2017; IUPAC 2019; Jiang vd. 2021.

^b Bileşikler anaerobik koşullar altında su ve toprakta çok daha kararlıdır.

^c Bileşikler asidik veya nötr pH koşulları altında hidrolize karşı stabildir, ancak alkali koşullar altında hidroliz meydana gelebilir. (pH 9).

GUS: Groundwater Ubiquity Score; yeraltı suyu yaygınlık puanı, potansiyel sızma indeksi

log *K_{ow}*: oktanol-su bölme katsayısının logaritması

log *K_{oc}*: Organik karbon bölme katsayısının logaritması

DT₅₀: Yarılanma süresi; dağılım süresi 50%.

Al [aktif ingredient]: etken madde

Bununla birlikte, tebukonazolün endokrin bozulması, üreme toksisitesi ve embriyonik toksisite gibi dikkate değer toksikolojik etkileri vardır (Ma vd., 2021) ve insanlar için potansiyel bir kanserojen risk oluşturmaktadır (Liu vd., 2016). Azol bileşiklerinin tarımda, eczacılıkta ve kişisel bakım ürünlerinde aşırı kullanımı, su, toprak ve su organizmalarında kontaminasyona neden olmuştur. Nehirlerde, atık sularında, göllerde ve haliçlerde azollerin biriktiği rapor edilmiştir (Pacholak vd., 2022).

Evsel kanalizasyon ve hastane atık sularının da yüksek miktarda azol bileşikleri içerdiği bildirilmiştir. Atık su arıtma tesisleri bu kaynaklardan büyük miktarda su alır ve azollerin giderilmesinde yetersizdir. Bu atık su arıtma tesislerinden çıkan atık suların doğal çevreye salınması, azol kirliliğinin başlıca kaynaklarından biridir (Peng vd., 2012). Tebukonazol (TEB), ((RS)-1-p klorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol), triazol ailesinin en iyi bilinen ve satılan sistemik fungusitidir. TEB'un ticari formülasyonu ve fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. TEB, yüksek lipofilik özelliklerinden dolayı toprakta çok kararludur ve toprak özelliklerine ve konjugenin başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak yarı ömrü 49-610 gündür (Sehonova vd., 2017). Yüzey sularında ve çiftliklerin yakınındaki sucul ortamlarda ölçülen TEB konsantrasyonlarının $9.1 \mu\text{g L}^{-1} \sim 200 \mu\text{g L}^{-1}$ aralığında olduğu tespit edilmiştir (Jiang vd., 2021). EPA (U.S.EPA, 2020) tarafından belirlendiği üzere, TEB'in balıklar için suda yaşam limit değeri $1135 \mu\text{g L}^{-1}$ 'dir. Midyeler suda yaşayan bentik organizmalar olduğundan sudaki kirleticilerin etkilerini en iyi yansıtan biyoindikatörlerden biridir (Naimo, 1995; Hongyi vd., 2009). *U. mancus*, IUCN Kırmızı Listesinde "Tehdit Altında" olarak listelenmiş olan bir tatlı su midye türüdür (IUCN, 2017). Literatürde TEB'in *U. mancus* üzerine toksik etkileriyle ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Sucul organizmalar

pestisitlere maruz kaldığında, oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen türlerinin üretimi artar. Bu reaktif oksijen türleri, hücredeki biyomoleküllerle etkileşime girerek hücre geçirgenliğini etkiler ve onları temizleyen antioksidan enzim sistemlerini değiştirir. Bu nedenle, sucul ekosistemlerde ksenobiyotiklerin neden olduğu oksidatif hasarın değerlendirilmesinde, sucul organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler ölçülür (Uçkun ve Öz, 2020). Biyolojik izleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan biyokimyasal göstergeler, oksidatif stres ilişkili parametreler ve biyotransformasyon enzimleridir (Perendija vd., 2007). Karboksilesteraz (CaE), suda yaşayan organizmalarda ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılan önemli esteraz enzimlerinden (Narra vd. 2015). Oksidatif stres ilişkili parametrelerden de en yaygın kullanılanları; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon S-transferaz (GST), Glutasyon redüktaz (GR), Glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA), Toplam antioksidan konsantrasyonu (TAC) ve Toplam oksidan konsantrasyonu (TOC)'dir.

Bu çalışmada, dünyada en yaygın kullanılan fungusitlerden TEB'in tehdit altındaki *U. mancus* üzerine kısa süreli (96 saat) toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, midyelerin sindirim bezi ve solungaç dokularında oksidatif stres parametrelerinden SOD, GPx, GST, GR, GSH MDA, TAC, TOC ve Oksidatif stres indeksi (OSI) ve biyotransformasyon enzimlerinden CaE aktivitesindeki değişimler değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METHOD

Hayvanlar ve deney koşulları

Atatürk Baraj Gölü'nün çevresinde tütün, pamuk ve bakliyat tarımı yapılmaktadır (Alkan Uçkun, 2017). Tatlı su midyesi *U. mancus* örnekleri baraj gölünde tarımın en yoğun yapıldığı, dolayısıyla pestisitlerin en çok uygulandığı

bölgelerden Temmuz 2019'da kafesli tırmık aleti yardımıyla temin edilmiştir. Toplanan midyeler, baraj gölü suyu ile doldurulmuş 15 L hacimli polipropilen tanklar ile uygun koşullar altında (seyyar hava motorları ile havalandırılarak) 1 saat içerisinde laboratuvara nakledilmiştir. Midyeler laboratuvara sevk edildikten sonra, damacana / pet su ile doldurulmuş 50 L hacimli polipropilen tanklara nakledilerek 2 hafta süreyle laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Tanklar sürekli hava pompaları yardımıyla havalandırılmış ve midyeler 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüde, oda sıcaklığında (23 ± 1 °C'de) tutulmuştur (Uçkun ve Alkan Uçkun, 2021). Adaptasyon sürecinde midyeler, üç günde bir sucul omurgasızlar için özel üretilmiş ticari konsantre fitoplankton (Roti-Rich™) ile beslenmiştir.

Toksisite testleri

İki haftalık adaptasyon süreci sonunda TEB'un *U. mancus* üzerindeki subletal toksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla bir kontrol ve dört maruziyet grubu olmak üzere toplam beş test grubu kurulmuştur. Tüm test grupları üç tekrarlı olacak şekilde oluşturulmuştur ve bu amaçla 37x24x16 cm boyutlarında 8.5 L hacimli polipropilen tanklara her doz için kendine ait 5 L pestisit (test) solüsyonu ve 5'er adet midye bırakılarak deney düzeneği kurulmuştur. Her bir tekrar grubunda beş hayvan olacak şekilde her grupta toplam on beş hayvan kullanılmıştır (n=15). Toksisite testlerinde TEB'in ticari formu (Orius® 250 EW, Adama, Türkiye) kullanılmıştır. Bu ticari formun aktif bileşeni 250 g Al L^{-1} olarak etiketlenmiştir. Akvaryum hava pompası yardımıyla test solüsyonu içeren tankların sürekli havalandırılması sağlanmıştır. Deney esnasında midyeler beslenmemiştir. Deneylerin başlangıcında (0. saat) YSI Pro Plus multiparametre cihazı kullanılarak, kontrol ve uygulama gruplarına ait su numunelerinin sıcaklığı, çözülmüş oksijen yüzdesi, pH ve iletkenliği, ölçülmüştür. Ortalama pH, iletkenlik, sıcaklık ve çözülmüş oksijen değerleri sırasıyla 7.44 (7.23 - 7.65), 25.45 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (22.90 - 28.00),

22.7 °C (21.4 - 24.0) ve 7.20 mg L^{-1} (7.00 - 7.40) olarak tespit edilmiştir. Midyeler, 96 saatlik statik yenileme test sisteminde öldürücü olmayan dört TEB konsantrasyonuna (1.5, 15, 150 ve 1500 $\mu\text{g Al L}^{-1}$) maruz bırakılmıştır. En düşük test konsantrasyonu ve diğer konsantrasyonlar geometrik olarak 10 kat fazlası olacak şekilde hesaplanmıştır. Bu aralık, TEB için Jiang vd. (2021) tarafından belirlenen çevresel kabul edilebilir konsantrasyonlar olan 9.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ~ 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığı ve U.S.EPA (2020) tarafından belirlenen balıklar için suda yaşam limit değeri 1135 $\mu\text{g L}^{-1}$ dikkate alınarak belirlenmiştir.

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonlarının belirlenmesi

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda sıvı kromatografisi çift kütle spektrometresi (LCMSMS, Shimadzu Quadropole 8040) kullanılarak belirlenmiştir. TEB'un tutulma süresinin yaklaşık 4 dakika olduğu tespit edilmiştir. TEB konsantrasyonlarının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi 0.5-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığında oluşturulmuştur. Tespit limiti ve ölçüm limiti, sırasıyla 0.95 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 3.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (r^2) 0.997 olarak bulunmuştur. TEB, 308.24 → 125.13 kütle-yük oranları (m/z) ve 308.10 → 70.13 m/z geçişlerinde tespit edilmiştir. Tebukonazol Pestanal analitik standardı, % ≥ 98.0 saflıkla Sigma-Supelco'dan satın alınmıştır. Her numune üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. LCMSMS cihaz koşulları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Biyokimyasal analizler

Midyelerden alınan sindirim bezleri ve solungaçlar tartılarak bıçak uçlu bir homojenizatörle (Heidolph RZR 2021) 0.1 M (0.5 M K_2HPO_4 + 0.5 M KH_2PO_4), pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içerisinde (1: 4 (w / v) oranında) homojenize edilmiştir. Homojenatlar 16.000 x g'de 4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich 460 R). Elde edilen

süpernatantlar, toplam protein konsantrasyonu ölçümleri ve enzim aktiviteleri için ependorf tüplerine aktarılmıştır. Mikroplaka okuyucu spektrofotometrede (Thermo, Varioscan Flash 2000) üç tekrarlı olacak şekilde okuma yapılmıştır. Toplam protein konsantrasyonları, Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde, numunelerin süpernatantları seyreltildikten sonra, 5 µl'si mikroplaka kuyularına pipetlenmiş ve üzerlerine 250 µL Bradford solüsyonu eklenmiştir.

Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Daha sonra seyreltme faktörü dikkate alınarak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplanmıştır. Tüm enzimlerin aktiviteleri, toplam protein seviyeleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol min⁻¹ mg toplam protein⁻¹) cinsinden ifade edilmiştir.

Tablo 2. LCMSMS'in enstrümantal koşulları

Cihaz modeli	Shimadzu LCMSMS-8040
Mobil faz A	1 mM amonyum asetat % 100 su içinde
Mobil faz B	% 100 metanol
Kolon	Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D. × 50 mm L, 3 µm)
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Akış hızı	0.4 mL dak ⁻¹
Arayüz akımı	4.5 kV
Püskürtme gazı akış hızı	3 mL dak ⁻¹
Kurutma gazı akış hızı	15 mL dak ⁻¹
DL sıcaklığı	250 °C
HB sıcaklığı	400 °C

CaE aktivitesini belirlemek için Santhoshkumar ve Shivanandappa (1999) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem mikroplaka okuyucu sistemine uyarlanmıştır. Substrat olarak 26 mM %96 etanol içinde hazırlanan p-nitrofenol asetat (PNPA) kullanılmıştır. Bu amaçla 5 µL numune ve 250 µL Tris tamponu (0.05 M, pH 7.4) mikroplaka kuyularına pipetlenmiş ve 25°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklara 5 µL PNPA eklenerek 0.5 mM nihai konsantrasyon elde edilmiş ve 405 nm'de 2 dakika süreyle distile suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Spesifik CaE aktivitesi nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır (PNPA için 405 nm $\epsilon = 1830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

SOD aktivitesi, Sun vd. (1988) tarafından geliştirilen yöntemine göre ölçülmüştür. Reaksiyonda ksantin ksantin oksidaz ile etkileşimi sonucu süperoksit radikalleri oluşmuştur. Bu süperoksit radikalleri

nitrobluetetrazolium ile etkileşime girerek 560 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilebilen renkli formazan boyası oluşturur.

GPx aktivitesinin ölçümünde Bell ve arkadaşlarının (1985) metodu mikroplaka okuyucu sistemine uyarlanmıştır. Bu yöntemde substrat olarak hidrojen peroksit (H₂O₂), katalaz inhibitörü olarak sodyum azit (NaN₃) kullanılmıştır. 10 µL süpernatant ve 60 µL 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 birim GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN₃ içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu mikroplaka kuyularına pipetlendikten sonra bu karışım 20°C'de 6 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 30 µL 1.67 mM H₂O₂ pipetlenerek reaksiyon başlatılmış, NADPH oksidasyonuna bağlı absorbans değişikliği, 25°C'de 3 dakika boyunca 340 nm'de kaydedilmiştir. Spesifik GPx aktivitesi nmol

min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır (NADPH için $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 340 nm'de).

GST aktivitesinde, Habig ve arkadaşlarının (1974) yöntemi mikrolaka sistemine uyarlanarak ölçülmüştür. Substrat olarak CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen), kofaktör olarak GSH kullanılmıştır. Mikrolaka kuyularına 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu, 100 µL GSH ve 10 µL CDNB karışımı pipetlenmiştir. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildikten sonra 15 saniye karıştırılmış ve 344 nm'de absorbanstaki değişim 25°C'de 2 dakika süreyle kaydedilmiştir.

GR aktivitesi, Cribb vd. (1989) tarafından geliştirilen yöntemin mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmasıyla belirlenmiştir. Reaksiyon, 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), NADPH ve numuneden oluşan reaksiyon çözeltisine oksitlenmiş glutatyon (GSSG) eklenerek başlatılmıştır. Reaksiyon sırasında GSSG'den GSH oluşumuna bağlı olarak DTNB miktarındaki azalmaya göre spesifik GR aktivitesi hesaplanmıştır.

GSH seviyesi, Moron ve arkadaşlarının (1979) metodunun mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış haline göre belirlenmiştir. GSH standart eğrisine karşı örneklerin 412 nm'deki absorban değeri okunarak GSH düzeyi nmol GSH mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

MDA konsantrasyonu, Placer vd. (1966) tarafından bazı modifikasyonlarla tarif edildiği gibi tiyobarbitürik asit reaktif madde analizine dayalı olarak ölçülmüştür. MDA içerikleri, standart olarak malondialdehit bis (dietyl asetal) kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans değeri 532 nm'de okunmuş ve MDA konsantrasyonu, nmol MDA mg protein⁻¹ olarak ifade edilmiştir. TAC ve TOC analizleri ticari test kitleri (Reel Assay Diagnostics) kullanılarak yapılmıştır (Erel, 2005). TAC analizinin prensibi, koyu mavi-yeşil stabil 2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin sülfonat (ABTS) radikalinin numunedeki antioksidanlar tarafından renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürülmesine

dayanmaktadır. Örnekteki antioksidanların miktarı, bu rengin yokluğu ile ilişkilidir. Analiz, Trolox eşdeğeri olarak bilinen bir E vitamini analogu olan stabil bir antioksidan standart solüsyon kullanılarak kalibre edilmiştir. TAC seviyeleri, 660 nm'de end-point ölçümü sonucu absorban değerlerinden hesaplanmış ve µmol Trolox eşdeğerleri L⁻¹ olarak ifade edilmiştir. TOC testinin prensibi, numunede bulunan oksidanların Fe²⁺ iyon-şelatör kompleksini Fe³⁺ iyonuna oksitlemesidir. Asidik bir ortamda Fe³⁺ iyonu kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur ve renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak belirlenir. Renk yoğunluğu, numunedeki toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır. Tespit için kalibrasyon, hidrojen peroksit ile gerçekleştirilmiştir. TOC seviyeleri, 530 nm'de end-point ölçümü sonucu absorban değerlerinden hesaplanmış ve mmol H₂O₂ eşdeğerleri L⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Oksidatif stres indeksini (OSI) hesaplamak için $[\text{OSI} = \text{TOC}/(\text{TAC} \times 10)]$ formülü kullanılmış ve sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir (Erel, 2005).

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22 (ABD) yazılım paketi ile gerçekleştirilmiştir. Shapiro-Wilk ve Levene testleri kullanılarak, tüm değişkenler sırasıyla normallik ve homojenlik açısından analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farkı test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama değer ± standart hata olarak sunulmuştur. Tüm analizler için p<0.05 ve p<0.01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları

LCMSMS analizinden elde edilen test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları Tablo 3'de gösterilmiştir. 24 saat sonraki gerçek konsantrasyonların, nominal konsantrasyonlardan yaklaşık ~%5-16 arasında daha düşük olduğu belirlenmiştir. Nominal ve gerçek

konsantrasyonlar arasındaki bu farklılıklar, yüzey aktif maddeler, çözücüler ve pestisitlerin ticari formülasyonlarında kullanılan koruyucular

gibi diğer bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir (Korkmaz vd., 2018).

Tablo 3. Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları (Ortalama±standart hata (N=3)).

Nominal konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gerçek konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1} \pm$ Standart hata)			
	Uygulamadan önce (0. saat)	Geri kazanım (%)	Uygulamadan sonra (24. saat)	Geri kazanım (%)
Kontrol	0	-	0	-
1.5	1.53 \pm 0.05	% 102.00	1.26 \pm 0.09	% 84.00
15	14.95 \pm 0.50	% 99.67	13.84 \pm 0.19	% 92.27
150	156.66 \pm 1.91	% 104.44	136.99 \pm 3.61	% 91.33
1500	1502.14 \pm 13.17	% 100.14	1429.55 \pm 32.21	% 95.30

Biyokimyasal yanıtlar

96 saatlik TEB maruziyeti sonrası *U. mancus*'un solungaç ve sindirim bezlerindeki biyokimyasal yanıtlar Tablo 4'de gösterilmiştir. CaE aktivitesi her iki dokuda da doza bağımlı olarak düşüş göstermiştir. Solungaç dokusunda sadece 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki düşüşler kontrole göre anlamlıyken sindirim bezinde tüm konsantrasyonlardaki düşüşler anlamlı olmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). En yüksek TEB konsantrasyonunda (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) CaE inhibisyonları, solungaçta kontrole göre yaklaşık olarak %35, sindirim bezinde ise %48 olarak hesaplanmıştır. SOD aktivitelerinde hem solungaçta hem de sindirim bezinde doza bağımlı artış gözlenmiştir. Solungaçta en fazla artış en yüksek TEB uygulama dozunda (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) görülürken, sindirim bezinde 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda görülmüştür. Her iki dokuda da 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozu hariç bütün dozlardaki artışlar kontrole göre anlamlı olmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). GPx aktivitesi de solungaç ve sindirim bezlerinde kontrole göre artmıştır. İki dokuda da en fazla artış 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda olmuştur ve kontrole göre anlamlıdır ($p < 0.05$, $p < 0.01$). GST aktivitesi solungaç ve sindirim bezinin her ikisinde de kontrole göre artış göstermiştir ancak bu artış solungaçta uygulanan TEB konsantrasyonu ile koordineli iken sindirim bezinde konsantrasyona bağımlı olmamıştır. Solungaçta 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozu hariç bütün

dozlardaki GST aktivitesi artışları kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Sindirim bezinde ise 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki artış kontrole göre $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ düzeylerinde önemliyken 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarındaki artışlar sadece $p < 0.05$ düzeyinde önemli, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki artış önemsiz bulunmuştur. GR aktivitesi solungaç ve sindirim bezinde tüm TEB dozlarında kontrole göre inhibisyona uğramıştır, ancak bu inhibisyonlar doza bağımlı olmamıştır. Sindirim bezindeki inhibisyonların tamamı kontrole göre önemliyken ($p < 0.05$, $p < 0.01$) solungaçta 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki inhibisyon $p < 0.05$ seviyesinde, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki inhibisyon $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. En fazla inhibisyon, solungaç ve sindirim bezinde sırasıyla %60 ve %50 oranlarında 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ uygulama dozunda olmuştur. GSH düzeyi solungaç ve sindirim bezinde TEB uygulamasına bağlı olarak kontrole göre düşmüştür. Bu düşüşler, solungaçta 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemsizken, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda $p < 0.05$ seviyesinde, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda ise $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemli bulunmuştur. Sindirim bezinde ise tüm uygulama dozlarında kontrole göre $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemli bulunmuştur. MDA seviyelerinde sadece 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemli artışlar

olmuştur. Bu fark sindirim bezinde $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemliyken solungaçta $p < 0.05$ seviyesinde önemlidir. TAC seviyesi, hem solungaçta hem de sindirim bezinde bütün TEB uygulama dozlarında doza bağımlı olarak ve kontrole göre önemli derecede düşmüştür ($p < 0.05$, $p < 0.01$). TOC seviyesi ise solungaçta

bütün dozlarda, sindirim bezinde sadece $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemli oranda artmıştır ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Oksidatif stres indeksinde (OSI) her iki dokuda da bütün dozlarda kontrole göre önemli artışlar olmuştur.

Tablo 4. 96 saat TEB maruziyeti sonrası *U. mancus*'un solungaç ve sindirim bezlerindeki biyokimyasal yanıtlar: (Enzim aktiviteleri, $\text{nmol dakika}^{-1} \text{mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata; GSH, MDA, TAC and TOC düzeyleri sırasıyla, $\text{nmol GSH mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata, $\text{nmol MDA mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata, $\mu\text{mol Trolox Equiv./L}$ ve $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{Equiv./L}$; OSI ise, AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edilmiştir.) (n=15).

		Konsantrasyonlar				
Biyobelirteçler		Control	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	15 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	1500 $\mu\text{g L}^{-1}$
Solungaç	CaE	307.54±14.45	261.30±33.17	238.02±	203.77±9.08**	200.11±14.32**
	SOD	5.38±0.19	6.81±0.38	7.93±0.66**	8.15±0.21**	10.34±0.50**
	GPx	15.31±0.75	19.24±0.58	21.15±1.59*	24.72±1.96**	22.35±1.57**
	GST	35.44±2.77	44.30±1.88	48.57±2.69**	51.32±1.54**	52.55±2.75**
	GR	26.60±1.26	16.69±3.98	17.11±3.29	16.15±1.55*	10.77±1.05**
	GSH	0.21±0.01	0.15±0.03	0.15±0.01	0.14±0.01*	0.09±0.01**
	MDA	0.95±0.08	1.44±0.26	1.45±0.02	1.52±0.07*	1.56±0.11*
	TAC	1.91±0.01	1.62±0.02**	1.56±0.02**	1.09±0.01**	1.00±0.02**
	TOC	1.27±0.03	2.73±0.09**	2.57±0.03**	2.45±0.01**	3.78±0.11**
	OSI	0.064±0.002	0.17±0.008**	0.16±0.002**	0.22±0.002**	0.38±0.004**
Sindirim Bezi	CaE	1036.69±33.20	765.46±82.15**	640.27±51.58**	611.48±31.64**	543.07±23.45**
	SOD	6.45±0.14	7.55±0.47	8.33±0.44**	9.00±0.33**	8.15±0.04**
	GPx	9.81±0.39	11.48±0.75	12.88±0.41**	12.98±0.37**	12.51±0.10**
	GST	30.69±1.45	48.42±6.33*	42.63±3.44	50.33±3.06*	83.56±4.59**
	GR	16.73±0.77	9.44±0.54**	9.31±0.64**	9.57±0.59**	8.32±0.50**
	GSH	0.13±0.002	0.12±0.001**	0.11±0.002**	0.11±0.001**	0.09±0.001**
	MDA	0.60±0.03	0.77±0.05	0.82±0.10	1.07±0.08**	1.30±0.12**
	TAC	1.98±0.04	1.39±0.01**	0.87±0.03**	0.84±0.04**	0.77±0.06**
	TOC	0.38±0.08	0.52±0.02	0.56±0.04	0.72±0.02**	1.22±0.02**
	OSI	0.02±0.005	0.03±0.001*	0.04±0.002**	0.06±0.002**	0.12±0.001**

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

** : $p < 0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

TARTIŞMA

Pestisitler de dahil olmak üzere birçok ksenobiyotik, hücre zarı boyunca elektron taşınmasının bozulması, Fenton reaksiyonunun kolaylaştırılması, antioksidan enzimlerin inaktivasyonu ve serbest radikal süpürücülerin tükenmesi gibi çeşitli biyokimyasal mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyebilir (Winston ve Di Giulio,

1991). Bu reaktif oksijen türlerini temizlemek için organizmalarda antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir ve bu antioksidan sistemlerin aktivasyon / inhibisyon düzeyi değerlendirilerek ksenobiyotiklerin organizmaya verdiği oksidatif hasar tahmin edilmektedir (Di Giulio ve Meyer, 2008). Bu çalışmada, TEB'in tatlı su midyelerine toksik etkileri, solungaç ve sindirim bezlerinde oksidatif stres parametreleri, antioksidan enzim seviyeleri ve

biyotransformasyon enzimindeki değişimler gözlemlenerek değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda önemli bir biyotransformasyon enzimi olan CaE, kontrole göre inhibisyona uğramıştır. CaE'ler, karboksilik esterler, tiyoesterler, amidler, karbamatlar ve çeşitli ksenobiyotikler gibi substratların hidrolizini katalize eden esteraz ailesinin üyeleridir. CaE'ler lipid metabolizması, ön ilaç aktivasyonu, pestisit metabolizması ve ftalatların hidrolizi gibi önemli fizyolojik süreçlerde yer alırlar (Lenfant vd., 2012). CaE aktivitesindeki inhibisyonlar, organizmanın strese adaptasyonu olarak düşünülebilir (De Lima vd., 2013). Sindirim bezleri, oral yolla alınabilen esterleri içeren yüksek konsantrasyonlarda toksinler nedeniyle CaE ekspresyonu için özellikle önemlidir (Ross vd., 2010). CaE'nin inhibisyonu, TEB maruziyetinin midyelerde normal detoksifikasyon fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak, literatürde, çeşitli sucül canlılarda pestisit maruziyetine bağlı olarak CaE inhibisyonu olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Denton vd., 2003; Wheelock vd., 2005; Uçkun ve Öz, 2020; Uçkun vd., 2021). SOD, organizmayı oksidatif stresten korumak için süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti temizleyen antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşenidir. Çalışmamızda önemli ölçüde artan SOD aktivitesi, ROS'u ortadan kaldırmak ve oksidatif stresi azaltmak için antioksidan savunma sisteminin aktive olduğunu göstermektedir (Van Rensburg vd., 1995). Sonuçlarımıza paralel olarak, Cao vd. (2018) larva zebra balıklarına 4 gün boyunca 0.05 mg/L dozunda azoksistrobin uygulamasına bağlı olarak SOD aktivitesinde önemli bir artış gözlemlemiştir. Uçkun ve Öz (2020) konazol grubu pestisitlerden olan penkonazolü 96 saat boyunca uyguladıkları kerevitlerin hepatopankreas dokularında SOD aktivitesinin kontrole göre önemli oranda arttığını gözlemlemiştir. GPx, GSH varlığında hidrojen peroksit ve lipid peroksit düzeylerinin

azalmasını katalize eden bir antioksidan enzimdir (Moreno vd., 2005). GPx enzimindeki inhibisyon, antioksidan sistemin pestisit yıkıcı etkisini önlemedeki başarısızlığını gösterebilir veya hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin bu enzimin sentezine doğrudan etkisi ile ilişkili olabilir (Yonar vd., 2014). Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda gözlemlenen GPx artışı, hücrede TEB'un neden olduğu oksidatif hasara karşı GPx'in koruyucu rolünü yansıtabilir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Jiang vd. (2018), yetişkin zebra balıklarında 24 saat azoxystrobine maruz kalmanın bir sonucu olarak tüm doz gruplarında GPx aktivitesinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. GST, Faz I detoksifikasyon ürünlerini suda daha çözünür bir forma dönüştüren konjugasyon işlevini yerine getiren bir Faz II detoksifikasyon enzimidir. Bu sayede reaktif serbest radikal birikimini ve hücre hasarı önler (Chahine ve O'Donnell, 2011). Çalışmamızda TEB konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak GST aktivitesinin artması, TEB'in solungaç ve sindirim bezinde GST üzerine doza bağlı toksik etkiye sahip olduğunu ve GST'nin de bu TEB'i detoksifiye etmek için aktivitesini arttırdığını düşündürmektedir. Aynı zamanda GST aktivitesindeki artış, H₂O₂'nin artan detoksifikasyonuna veya TEB'in faz II biyotransformasyonunun bir parçası olarak konjugasyon işlevine bağlanabilir (Hemalatha vd., 2015). Benzer şekilde, Korkmaz vd. (2018), zebra balıklarında (*Danio rerio*) 96 saat maruziyetten sonra GST'nin fosolon bazlı ve sipermetrin bazlı pestisitler tarafından indüklendiğini gözlemlemiştir. Literatürde pestisit uygulanan sucül canlılarda GST aktivitesinin arttığını ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır (Sayeed vd., 2003; Oruç, 2010; Moreira vd., 2010; Uçkun ve Öz, 2021; Uçkun ve Özmen 2021). GR, hücrede genel homeostatik oksido indirgeyici denge sağlayarak azaltılmış glutatyon durumunu korur, böylece hücreleri reaktif oksijen metabolitlerine karşı korur (Djordjevic vd., 2010). Çalışmamızda GR'nin inhibe olmasının nedeni, yüksek konsantrasyonlarda TEB uygulamasından dolayı

meydana gelen oksidatif stres olabilir. GR, GSSG'den GSH'nin geri dönüşümüne katılarak hücreye antioksidan koruma sağlar (Elia vd., 2003). GR'nin etkisi ile hücre içindeki GSH ve GSSG arasındaki denge, GSH'nin geri dönüşümü ile sağlanır (Schafer ve Buettner, 2001). Bu nedenle GSH, GSSG ve toplam glutatyon içerikleri de azalır, dolayısıyla glutatyon içeren savunma sistemi yüksek doz TEB maruziyetine karşı zayıf kalır. GSH, pestisit maruziyeti nedeniyle ROS üretimini kontrol etmede rol oynayan enzimatik olmayan bir antioksidandır (Parke ve Piotrowski, 1996). Oksijen radikallerine maruz kalmak GSH düzeyinde artışa neden olur (Dickinson ve Forman, 2002). Çalışmamızda GSH düzeyindeki düşüş, TEB uygulamasının neden olduğu oksidatif stres koşullarında tüketilen GSH'nin üretilen GSH'den daha hızlı olduğunu göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biri olan MDA, hücre zarlarındaki iyon geçirgenliğini bozar, zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve enzimlerin aktivitesini bozar (Mercan, 2004). Çalışmamızda, uygulanan TEB konsantrasyonunun artması nedeniyle MDA düzeyindeki artışlar, MDA'nın lipid peroksidasyonunun son ürünü olması nedeniyle, TEB'in biyomoleküllerde önemli oksidatif hasara neden olduğunu ve yüksek düzeyi, serbest radikallerin aşırı üretildiğini ve hücre zarlarına hasarının olduğunu göstermektedir (Abhijith vd., 2016).

TAC, biyolojik numunelerde toplam antioksidan kapasiteyi bulmak için kullanılan bir test solüsyonu tarafından temizlenen serbest radikal miktarının bir ölçüsüdür. TOC ise tüm antioksidan sistemin serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneğini ölçmek için kullanılan bir parametredir. TAC ve TOC, organizmaların ksenobiyotiklerin neden olduğu oksidatif strese karşı biyolojik tepkilerini tahmin etmede faydalı biyobelirteçlerdir (Pinchuk vd., 2012; Regoli, 2000). TAC'nin enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların toplamı olduğu

varsayılmaktadır (Mahfouz vd., 2009). Çalışmamızda TAC seviyesinin TEB uygulamasına bağlı olarak düşmesinin nedeni, TEB'in solungaç ve sindirim bezinde yarattığı oksidatif strese tepki olarak enerji tüketimi olarak açıklanabilir. Bulgularımıza paralel olarak Hamed vd., (2020), mikroplastiklere maruz bıraktıkları *Oreochromis niloticus*'ta doz arttıkça TAC seviyesinin düştüğünü gözlemlemiştir. Uçkun ve Uçkun (2021), su ve sedimentinde yoğun metal bulunan bölgelerden topladıkları sazan balıklarının karaciğerinde TAC seviyesinin temiz bölgelere göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. TOC, bir kimyasal indükleyicinin organizmada oluşturduğu toplam oksidan molekül miktarını yansıtır. Çalışmamızda TOC seviyesinin artması, TEB'in oksijen radikallerine bağlanarak onları hücrede ROS üretimini artıran ve antioksidan enzimleri inhibe eden çeşitli reaktif metabolitlere dönüştürmesine yorulabilir (Vahdati Hassani vd., 2018). OSI, organizmada oksidatif strese neden olan serbest radikal oluşturucu ajanlar ile bunlara karşı antioksidan savunma sistemleri arasındaki ilişkinin derecesini gösteren bir göstergedir (Sayed ve Khalil, 2016). Çalışmamızda uygulanan TEB konsantrasyonu arttıkça OSI değerinin kontrole göre anlamlı olarak artması TAC ve TOC bulgularımızı desteklemektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, TEB'in, antioksidan enzimlerin aktivitesini bozarak ve GSH, MDA, TAC ve TOC seviyelerini değiştirerek oksidatif stresi indüklediği söylenebilir. Ayrıca TEB uygulaması nedeniyle CaE inhibisyonun gözlenmesi, TEB'in kısa süreli uygulamalarda biyotransformasyon sistemini uyarabileceği bilgisini vermektedir. Literatürde *U. mancus* üzerine pestisitlerden penkonazol (Yoloğlu, 2019) ve imidaklopritin (Uçkun ve Alkan Uçkun, 2021) toksik etkilerine yönelik çalışmalar mevcuttur ancak TEB'e ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda

çalışmamız TEB'in hedef dışı organizmalar üzerindeki toksik etkileri ile ilgili literatüre önemli bir katkı sağlamıştır. Sonuçlarımız, TEB'in düşük konsantrasyonlarda bile *U. mancus* üzerinde önemli toksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle TEB'in kullanıldığı tarım alanlarına yakın tatlı sularda yaşayan *U. mancus* 'un tehdit altında olabileceğini söyleyebiliriz.

AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Çalışma, tatlısu midyesi (mollusca-bivalvia) ile yapıldı. Tatlı su midyeleri omurgasız hayvanlar grubuna girdiğinden dolayı bu gruptaki hayvanlara etik kurul raporu gerekmemektedir.

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

KAYNAKLAR

- Abhijith, B.D., Ramesh, M., Poopal, R.K. (2016).** Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 77, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.11.002>
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R., Perfect, J. (2015).** Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(6), 787-98. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032939>
- Alkan Uçkun, A. (2017).** Ecotoxicological evaluation of pesticide pollution in Ataturk dam Lake (Euphrates River), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(2), 313-321. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_2_10
- Bell, J.G., Cowey, C.B., Adro, J.W., Shanks, A.M. (1985).** Some effects of vitamins and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 53, 149–57. <https://doi.org/10.1079/BJN19850019>
- Bhagat, J., Singh, N., Nishimura, N., Shimada, Y. (2021).** A comprehensive review on environmental toxicity of azole compounds to fish. *Chemosphere*, 262, 128335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128335>
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cao, F., Wu, P., Huang, L., Li, H., Qian, L., Pang, S., Qiu, L. (2018).** Short-term developmental effects and potential mechanisms of azoxystrobin in larval and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 198, 129-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.023>
- Chahine, S., O'Donnell, M.J. (2011).** Interactions between detoxification mechanisms and excretion in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 214, 462-8. <https://doi.org/10.1242/jeb.048884>
- Cribb, A.E., Leeder, J.S., Spielberg, S.P. (1989).** Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 183, 195–6. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90188-7)
- De Lima, D., Roque, G.M., De Almeida, E.A. (2013).** In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research*, 91, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>
- De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. (2014).** Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles. Springer India, New Delhi, pp 59–81.
- Denton, D.L., Wheelock, C.E., Murray, S.A., Deanovic, L.A., Hammock, B.D., Hinton, D.E. (2003).** Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(2), 336-341. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220214>
- Di Giulio, R.T., Meyer, J.N. (2008).** Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 273-324.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J. (2002).** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019–26. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Niciforovic, A., Radojic, M.B. (2010).** Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiological Research*, 59(5), 729-36.
- EFSA. (2008).** European Food Safety Authority, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penconazole. *EFSA Scientific Report*, 175, 1–104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.119r>
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L. (2003).** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55,162-7. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00123-9)
- Erel, O. (2005).** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-11. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>

- García-Valcárcel, A.I., Tadeo, J.L. (2012).** Influence of moisture on the availability and persistence of clotrimazole and fluconazole in sludge-amended soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 501-7. <https://doi.org/10.1002/etc.1711>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974).** Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hamed, M., Soliman, H.A.M., Osman, A.G.M., Sayed, A.E.H. (2020).** Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 14581-8. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07898-y>
- Hemalatha, D., Amala, A., Rangasamy, B., Nataraj, B., Ramesh, M. (2015).** Sublethal toxicity of quinalphos on oxidative stress and antioxidant responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*, 31, 1399-406. <https://doi.org/10.1002/tox.22145>
- Hongyi, N., Wenjing, D., Qunhe, W., Xingeng, C. (2009).** Potential toxic risk of heavy metals from sediment of the Pearl River in South China. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1053-58. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62381-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62381-5)
- IUCN. (2021, October 24).** *Unio mancus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*: e.T22737A42466471. (Lopes-Lima, M., Seddon, M.B. (2014)). <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-3.RLTS.T22737A42466471.en>.
- IUPAC (2021, October 5)** Tebuconazole (Ref: HWG 1608), Environmental fate-ecotoxicology-human health-A to Z index. Retrieved from <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/610.htm>.
- Janna, H., Scrimshaw, M.D., Williams, R.J., Churchley, J., Sumpter, J.P. (2011).** From Dishwasher to Tap? Xenobiotic Substances Benzotriazole and Tolytriazole in the Environment. *Environmental Science and Technology*, 45(9), 3858-64. <https://doi.org/10.1021/es103267g>
- Jiang, J., Chen, L., Liu, X., Wang, L., Wu, S., & Zhao, X. (2021).** Histology and multi-omic profiling reveal the mixture toxicity of tebuconazole and difenoconazole in adult zebrafish. *Science of The Total Environment*, 795, 148777.
- Jiang, J., Shi, Y., Yu, R., Chen, L., Zhao, X. (2018).** Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. *Chemosphere*, 202, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.055>
- Korkmaz, V., Güngördü, A., Ozmen, M. (2018).** Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 265-72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.055>
- Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A. (2012).** ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Research*, 41, 423-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1154>
- Liu, N., Dong, F., Xu, J., Liu, X., Zheng, Y. (2016).** Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.007>
- Ma, F., Li, Y., Yu, Y., Li, Z., Lin, L., Chen, Q., Xu, Q., Pan, P., Wang, Y., Ge, R.S. (2021).** Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal leydig cells. *Chemosphere*, 262, 127792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127792>
- Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2009).** Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 91, 805-11. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.022>
- McNeill, K.S., Cancilla, D.A. (2009).** Detection of triazole deicing additives in soil samples from airports with low, mid, and large volume aircraft deicing activities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 265-9. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9626-z>
- Mercan, U. (2004).** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-6.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Rendón-von Osten, J., Da Silva, E.M., Ribeiro, R., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. (2010).** Ecotoxicological tools for the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 893-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.04.007>
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gomez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C. M., Camean, A. M. (2005).** Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol*, 45(4), 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.11.001>
- Moron, M.S., Depierre, J.W., Mannervik, B. (1979).** Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 582(1), 67-78. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(79\)90289-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(79)90289-7)
- Naimo, T.J. (1995).** A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*, 4, 341-62. <https://doi.org/10.1007/BF00118870>
- Narra, M.R., Rajender, K., Reddy, R.R., Rao, J.V., Begum, G. (2015).** The role of vitamin C as antioxidant in protection biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere*, 132, 172-8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.006>

- Nikolaou, S., Efstathiou, P., Tiggiridou, M., Arabatzis, N., Piera, Y., Aletrari, M. (2017). Monitoring of pesticides in drinking, surface and ground water of Cyprus by liquid-liquid and solid phase extraction in combination with GC/MS and UPLC/MS/MS. *Journal of Water Resource and Protection*, 9, 1184–98. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2017.910077>
- Nong, Q.Y., Liu, Y.A., Qin, L.T., Liu, M., Mo, L.Y., Liang, Y.P., Zeng, H.H. (2021). Toxic mechanism of three azole fungicides and their mixture to green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere*, 262, 127793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127793>
- Oruç, E.Ö. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 160-6. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- Pacholak, A., Burlaga, N., Frankowski, R., Zgola-Grzeškowiak, A., Kaczorek, E. (2022). Azole fungicides:(Bio) degradation, transformation products and toxicity elucidation. *Science of the Total Environment*, 802, 149917. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149917>
- Parke, D.V., Piotrowski, J.K. (1996). Glutathione: its role in detoxication of reactive oxygen species and environmental chemicals. *Toxicology*, 4(1), 1–13.
- Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, Z., Wang, C. (2012). Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Science of the Total Environment*, 426, 311-17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.067>
- Perendija, B.R., Borkovic, S.S., Kovacevic, T.B., Pavlović, S.Z., Stojanović, B.D., Paunovic, M.M., Cakic, P.D., Radojicic, R.M., Pajović, S.B., Saičić, Z.S. (2007). Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Archives of biological sciences*, 59(3), 169-75. <http://dx.doi.org/10.2298/ABS0703169P>
- Pinchuk, I., Shoal, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165, 638-47. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003>
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- PPDB. (2021, October 24). Pesticide Properties DataBase. University of Hertfordshire. Retrieved from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/509.htm>
- Regoli, F. (2000). Total Oxylradical Scavenging Capacity (TOSC) in Polluted and Translocated Mussels: A Predictive Biomarker of Oxidative Stress. *Aquatic Toxicology*, 50, 351-61. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00091-6)
- Ross, M.K., Streit, T.M., Herring, K.L., Xie, S. (2010). Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Journal of Pesticide Science*, 35, 257–64. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-07>
- Santhoshkumar, P., Shivanandappa, T. (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 119, 277–82. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(99\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(99)00037-x)
- Sayed, A.E.H., Abu Khalil, N.S. (2016). Oxidative Stress Induction in Monosex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758): A Field Study on the Side Effects of Methyltestosterone. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000416>
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 295-301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1191-212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Sehonova, P., Phalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Prokes, M., Tichy, F., Fiorino, E., Faggio, C., Svobodova, Z. (2017). Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere*, 188, 414–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.151>
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497–500. <https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497>
- U.S.EPA (2020). Aquatic life benchmarks and ecological risk assessments for registered pesticides. Retrieved April 7, 2021, from <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk>.
- Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2020). Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), 35626-37. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09595-2>
- Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2021). Evaluation of the acute toxic effect of azoxystrobin on non-target crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) by using oxidative stress enzymes, ATPases and cholinesterase as biomarkers. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(5), 550-7. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1774604>
- Uçkun, A.A., Uçkun, M. (2021). Evaluation of Some Biomarkers in Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) Depending on Water and Sediment Pollution of Atatürk Dam Lake. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(3), 744-53. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.898021>
- Uçkun, M., Alkan Uçkun, A. (2021). Tatlı Su Midyelerine (Unio mancus) İmidakloprid Uygulanmasının Solungaç ATPaz Aktiviteleri Üzerine Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 37(1), 91-98.

- Uçkun, M., Özmen, M. (2021). Evaluating Multiple Biochemical Markers in *Xenopus laevis* Tadpoles Exposed to the Pesticides Thiacloprid and Trifloxystrobin in Single and Mixed Forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2846-60. <https://doi.org/10.1002/etc.5158>
- Uçkun, M., Yoloğlu, E., Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2021). Acute Toxicity of Insecticide Thiamethoxam to Crayfish (*Astacus leptodactylus*): Alterations in Oxidative Stress Markers, ATPases and Cholinesterase. *Acta Chimica Slovenica*, 68(3), 521-31. <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2021.6823>
- Vahdati Hassani, F., Abnous, K., Mehri, S., Jafarian, A., Birner-Gruenberger, R., Yazdian Robati, R., Hosseinzadeh, H. (2018). Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.021>
- Van Rensburg, S.J., Carstens, M.E., Potocnik, F.C.V., Van Der Spuy, G., Van Der Walt, B.J., Taljaard, J.J.F. (1995). Transferrin C2 and Alzheimer's disease: another piece of the puzzle found? *Medical Hypotheses*, 44(4), 268-72. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90178-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90178-7)
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A., Hammock, B.D. (2005). Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 172-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.009>
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, 19(2), 137-61. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6)
- Yonar, S.M., Ural, M.Ş., Silici, S., Yonar, M.E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 202-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.007>
- Yoloğlu, E. (2019). Assessment of Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, and Total-ATPase Activities in Gills of Freshwater Mussels Exposed to Penconazole. *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 88-92. <https://doi.org/10.31594/commagene.632082>

Yumurtaya verilen monosodyum glutamat'ın tavuk embriyolarında medulla spinalisin servikal bölgesinin embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

The determination of effects of in ovo administered monosodium glutamate on the embryonic development of cervical region of medulla spinalis in chicken

ÖZET

Bu çalışmada, dünyada en yaygın kullanılan lezzet artırıcı gıda katkı maddelerinden biri olan monosodyum glutamat (MSG)'ın, medulla spinalis'in embriyonik gelişimi üzerine etkilerinin histolojik ve histometrik yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada 410 adet dömlü tavuk yumurtası kullanıldı. Yumurtalar kontrol, distile su, 0,12, 0,6 ve 1,2 mg/g yumurta MSG olmak üzere beş gruba ayrıldı ve enjeksiyonlar kuluçka başlangıcında yumurta sarısına yapıldı. Kuluçkanın 15, 18 ve 21. günlerinde her gruptan 10 yumurta açılarak elde edilen embriyolardan medulla spinalis doku örnekleri alındı. Doku örnekleri %10'luk formolde tespit edildikten sonra rutin histolojik yöntemlerle parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksisilen Eozin, Kluver-Barrera, Toluidine Blue, Periyodik Asit Schiff ve Crossmon'ın üçlü boyama yöntemi ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskop altında incelenildi ve medulla spinalis dokusunda histometrik ölçümler yapıldı. 15. gün elde edilen embriyolarda yapılan histometrik ölçümler sonucunda substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı dikkate alındığında kontrol ve MSG grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. 18. günde substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı açısından özellikle 0,6 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla arttığı tespit edildi. 21. günde ise substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranının 0,6 mg/g ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan grupta kontrol ve distile su grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi. Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çapları üzerinde yapılan değerlendirmelerde ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının azaldığı dikkati çekti. Medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda 15., 18. ve 21. günlerde nekroz ve nöronofaji gibi histopatolojik değişikliklere rastlandı, MSG grupları kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$). Sonuç olarak inkübasyondan hemen önce dömlü tavuk yumurtasına verilen MSG'nin medulla spinalisin embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve motor nöronlarda nekroza neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Embriyotoksisite, medulla spinalis, monosodyum glutamat, tavuk embriyo

ABSTRACT

In this study, the aim was to determine the effects of monosodium glutamate (MSG), one of the most widely used flavor enhancing food additives in the world, on the embryonic development of the spinal cord by histological and histometric methods. For this purpose, 410 fertilized chicken eggs were divided into 5 groups as control, distilled water, 0.12, 0.6 and 1.2 mg/g egg MSG and injections were performed via the egg yolk. On the 15th, 18th and 21st day of incubation, medulla spinalis tissue samples were taken from the embryos and chicks.

How to cite this article

Bölükbaş, F., Öznurlu Y. (2021). The determination of effects of in ovo administered monosodium glutamate on the embryonic development of cervical region of medulla spinalis in chicken. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 298-311. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1015200>

Research Article

Ferhan Bölükbaş^{1a}
Yasemin Öznurlu^{2b}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selçuk, Konya, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-9744-0242](https://orcid.org/0000-0002-9744-0242)

^b[0000-0002-6296-3107](https://orcid.org/0000-0002-6296-3107)

Correspondence

Ferhan BÖLÜKBAŞ

ferhan.bolukbas@aksaray.edu.tr

Article info

Submission: 26-10-2021

Accepted: 30-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



As a result of histometric measurements made in embryos obtained on the 15th day, it was determined that there was no significant difference between the control and MSG groups when the ratio of the substantia grisea surface area to the total surface area of the medulla spinalis was taken into account. On the 18th day, it was determined that the ratio of the surface area of the substantia grisea to the total surface area of the medulla spinalis in the sections increased especially in the group administered MSG at 0.6 mg/g egg dose compared to the control group. On the 21st day, it was determined that the ratio of the surface area of the substantia grisea to the total surface area of the medulla spinalis in the sections was decreased in the 0.6 mg/g and 1.2 mg/g MSG group compared to the control and distilled water groups. In the evaluations made on the transverse and longitudinal diameters of the canalis centralis, it was seen that the transverse and longitudinal diameters of the canalis centralis decreased in the MSG groups compared to the control and distilled water groups. Histopathological changes such as necrosis and neuronophagia were observed on the 15th, 18th and 21st days in the groups treated with MSG in the motoric neurons of the ventral cornus of the spinal cord. When the MSG groups were compared with the control and distilled water groups, a significant increase in necrosis in motor neurons was seen ($p < 0.05$). As a result, it was determined that in ovo administered MSG could adversely affect the embryonic development of the medulla spinalis and cause necrosis in motor neurons.

Keywords: Chicken Embryos, embryotoxicity, medulla spinalis, monosodium glutamate

GİRİŞ
Gıda katkı maddeleri içerisinde lezzet arttırıcı maddelerin çok önemli bir yeri vardır. Monosodyum Glutamat (MSG, E621), son yıllarda hazır gıdaya olan talebin artmasıyla birlikte, gıda sanayiinde, restoranlarda, paketlenmiş ve dondurulmuş hazır gıdalarda en yaygın kullanılan lezzet arttırıcı gıda katkı maddelerinden birisidir (Zanfirescu vd., 2019). Özellikle Çin, MSG'nin üretim ve tüketiminde dünyada başı çekerken, onu Endonezya, Vietnam ve Tayland gibi birkaç güneydoğu Asya ülkesi takip etmektedir (Nguyen vd., 2020). Sanayileşmiş ülkelerde günlük ortalama MSG alımının 0.3-1 g olduğu tahmin edilmektedir (Geha vd., 2000). Avrupa ülkelerinde ortalama MSG alımı 0.3 ila 0.5 g/gün arasında değişirken Asya'da bu oran daha yüksektir; Örneğin Japonya'da 1.1-1.6 g/gün, Tayvan'da 1.5-3.0 g/gün, Güney Kore'de 1.6-2.3 g/gün'dür (Beyreuther vd., 2007; Nguyen vd., 2020). Çin Restoranı Sendromu'nun tanımlanmasından sonra MSG'nin insanlarda ve hayvanlarda toksik etkilerini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Williams & Woessner, 2009). Bu çalışmalar MSG'nin hepatotoksisite, nörotoksisite, genotoksisite, immunotoksisiteye neden olduğunu ve obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Gad vd., 2021; Hegazy vd., 2017; Kazmi vd., 2017; Nguyen vd., 2020; Oladipo vd., 2015; Zanfirescu vd., 2019). MSG'ye maruz

kalan erişkinlerde önemli etkiler gözlenirken, fetal dönemde ve yaşamın ilk yıllarında maruziyet yaşam boyunca çok daha ciddi etkilere neden olabilir. Hegazy vd. (2017), ratlarda gebelik sırasında annelere MSG verilmesinin fetal akciğer dokularında büyüme geriliğine ve histopatolojik değişikliklere neden olabileceğini göstermişlerdir. Miko vd. (2016), maternal MSG maruziyetinin ratlarda ciddi intrauterin büyüme geriliğine ve nörotoksik etkilere neden olabileceğini bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda MSG'nin; hafızada bozulma, depresif ve anksiyojenik davranışlar ve analjezik tepkilerdeki değişiklikler gibi nöroendokrin anormalliklere neden olabileceği bildirilmiştir (López-Pérez vd., 2010; Quines vd., 2014). Ayrıca ratlarda on gün boyunca subkutan veya oral yolla MSG maruziyeti sonucu beyin hafızadan sorumlu olan bölgesi olan hipokampus bölgesinde β -Amiloid plak birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Dief vd., 2014). Kemirgenlerdeki MSG toksisitesinin hipokampus, optik sinir, retina ve korteksin çeşitli bölgelerinde dejenerasyona neden olduğu bilinmektedir (Beas-Zárate vd., 2002; Chambille & Serviere, 1993; Olney, 1969).

MSG'nin nörotoksik etkileri hakkında çok sayıda çalışma olmasına rağmen medulla spinalis'in gelişimi üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. İnsanlar ve memeliler gebelikleri boyunca farklı kimyasallara maruz kalabilmekte ve bunun

sonucunda da embriyonik gelişim olumsuz etkilenebilmektedir (Atay vd., 2020). Bazı kimyasal maddelerin toksik, teratojenik ve gelişimsel etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar insanlar üzerinde yapılamadığından bu kimyasallar hayvan modelleri üzerinde test edilmektedir. Jelinek (1977) pekçok kimyasalın embriyolojik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği araştırmalarda kullanılan, döllenmiş tavuk yumurtalarının kullanıldığı Tavuk Embriyotoksiste Tarama Testi-CHEST adlı bir yöntem geliştirmiştir. CHEST yöntemi ile belirlenen toksik dozun sulandırma oranının 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen sonucun, memelilerde anneye ait canlı ağırlığın kg'mı başına mg düzeyinde alınması gereken toksik doz olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Jelinek, 1977). Tavuk embriyo modeli, in vivo çalışmalar için sıklıkla tercih edilen basit, düşük maliyetli, erişilebilir ve tekrarlanabilir bir modeldir. Ayrıca, tavuk embriyosunun nöral ve spinal gelişim aşamaları, insan embriyosunun gelişim aşamalarına çok benzemektedir (Atay vd., 2020). Bu amaçla embriyolojik, anatomik ve gelişimsel biyoloji çalışmalarında materyal olarak civciv embriyoları tercih edilmiştir (Atay vd., 2020; Çetin & Özaydın, 2021; Kandil & Sur, 2018; Öznurlu vd., 2021). Bu çalışmada model organizma olarak tavuk embriyoları kullanılmış ve MSG'nin medulla spinalis'in embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin, histolojik ve histometrik metodlarla belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METHOD

Çalışmada sağlıklı ticari Babcock Brown ırkına ait elde edilen toplam 410 adet döllü tavuk yumurtası (50-55 g) kullanılmıştır. Her grup için MSG dozları 55g yumurta ağırlığına göre belirlendi. MSG (L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate, Sigma) hassas terazi ile tartılarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve otoklavda sterilize edilmiş distile su ilave edilerek sulandırıldı. 100 µL hacimde 0,12, 0,6 ve 1,2

mg/g yumurta MSG içeren test çözeltileri hazırlandı.

Enjeksiyondan önce yumurtalar kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat +42 mL formaldehit/m³ karışımıyla elde edilen buhar altında 15 dakika süreyle dezenfekte edildi. Daha sonra yumurtalar 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (Kontrol grubu, n=40 yumurta), Grup 2 (Distile su grubu, n=62 yumurta), Grup 3 (0,12 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=80 yumurta), Grup 4 (0,6 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=90 yumurta) ve Grup 5 (1,2 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=138 yumurta). Gruplardaki yumurta sayıları embriyonik ölümler dikkate alınarak belirlendi. Enjeksiyon gruplarında yumurta kabuğu üzerindeki enjeksiyon bölgeleri dezenfeksiyon için %96'lık etanolle silindi. Tüm enjeksiyonlar yumurta sarısına ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Yumurtanın yan tarafından özel yumurta delicisi ile bir delik açılarak, steril insülin enjektöründen 100 µL/yumurta test solüsyonu enjekte edildi ve ardından delikler sıvı parafin ile kapatıldı. Kuluçka işlemleri, optimal koşullarda (37,5 °C sıcaklık ve %65 nispi nem) kuluçka makinesinde gerçekleştirildi.

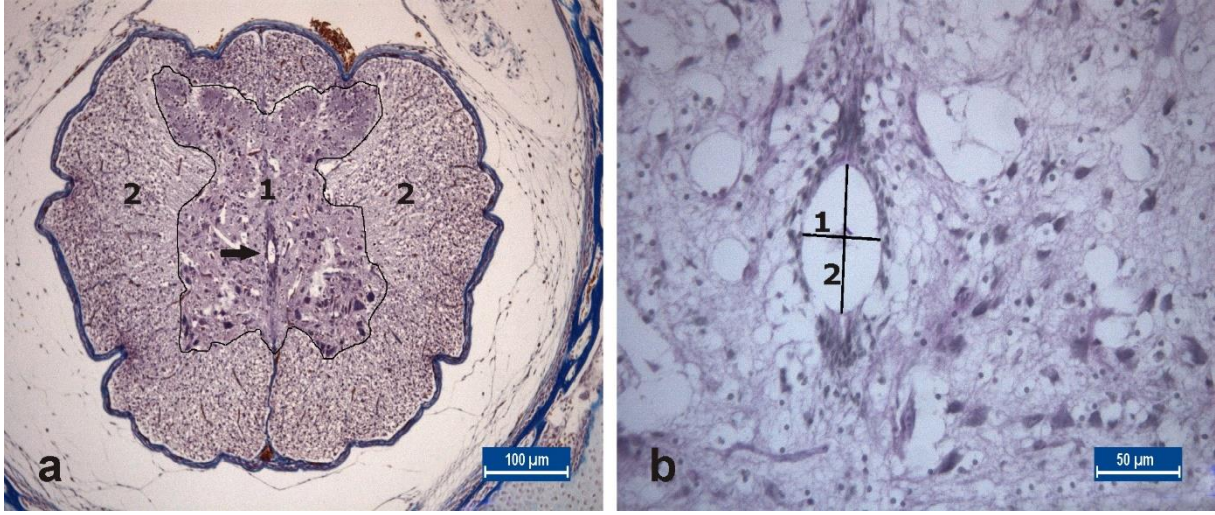
Kuluçkanın 15, 18 ve 21. günlerinde, her gruptan rastgele seçilen 10'ar adet yumurta açılarak, elde edilen embriyolardan alınan medulla spinalis dokusu örnekleri %10'luk formolde tespit edildi ve rutin histolojik yöntemlerle yıkama, dehidrasyon ve parlatmayı takiben parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Crossmon'ın üçlü boyama yöntemi, Hematoksilen Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS), Toluidine Blue ve Kluver-Barrera boyama yöntemleri ile boyandı.

Histometrik Ölçümler

Histometrik ölçümler kuluçkanın 15, 18 ve 21. gününde elde edilen medulla spinalis dokusundan alınan seri kesitlerde gerçekleştirildi. Medulla spinalis dokusu servikal segmentte değerlendirilmeye alındı. Her bir hayvana ait 3 seri kesitte substantia grisea

yüzey alanının medulla spinalis'in toplam yüzey alanına oranları hesaplandı (Şekil 1a). Ayrıca medulla spinalis'in servikal segmentine ait seri kesitlerde kanalis sentralis'in enine ve boyuna

çap ölçümleri yapıldı (Şekil 1b). Tüm histometrik ölçümler Leica IM50 ölçüm programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. a. Servikal segmentten alınan bir kesit. Çizgiler ile sınırlanan 1: Substantia grisea, 2: Substantia alba bölgeleri. Üçlü boyama. Bar: 100 µm. b. medulla spinalis'in servikal segmentinden alınan bir kesitte kanalis sentralisin enine (1 numaralı siyah bar) ve boyuna (2 numaralı siyah bar) çapları, PAS boyama. Bar: 50 µm.

Histopatolojik Değerlendirmeler

Her grupta bulunan tüm örnekler medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlardaki nekroz ve nöronofaji açısından ışık mikroskobu altında (Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) değerlendirildi ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri (x400 büyütme) kaydedildi, ardından IM-50 görüntü analiz programı (AG CH-9435; Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) ile her alanda rastgele seçilen 10000 µm²'lik altı farklı alanda normal ve nekrotik motor nöronlar sayılarak nekrotik nöron yüzdesi hesaplandı (nekrotik motor nöron sayısı/ toplam nöron sayısıX100). Tüm değerlendirmeler, numune tanımlamasına kör iki araştırmacı tarafından yapıldı.

İstatistik Analizler

Elde edilen veriler istatistik paket programı (SPSS 25, IBM Corp. Released 2017) yardımıyla analiz edildi. Medulla spinalis dokusundan alınan kesitlerde substantia grisea'nın yüzey alanının kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranları arasındaki farkın belirlenmesi, kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının

değerlendirilmesi ve nekrotik nöron yüzdesi tek yönlü varyans analizi, ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi ile analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. $p < 0.05$ değeri önemli kabul edildi.

BULGULAR

Medulla Spinalis Dokusuna ait Histolojik ve Histometrik Bulgular

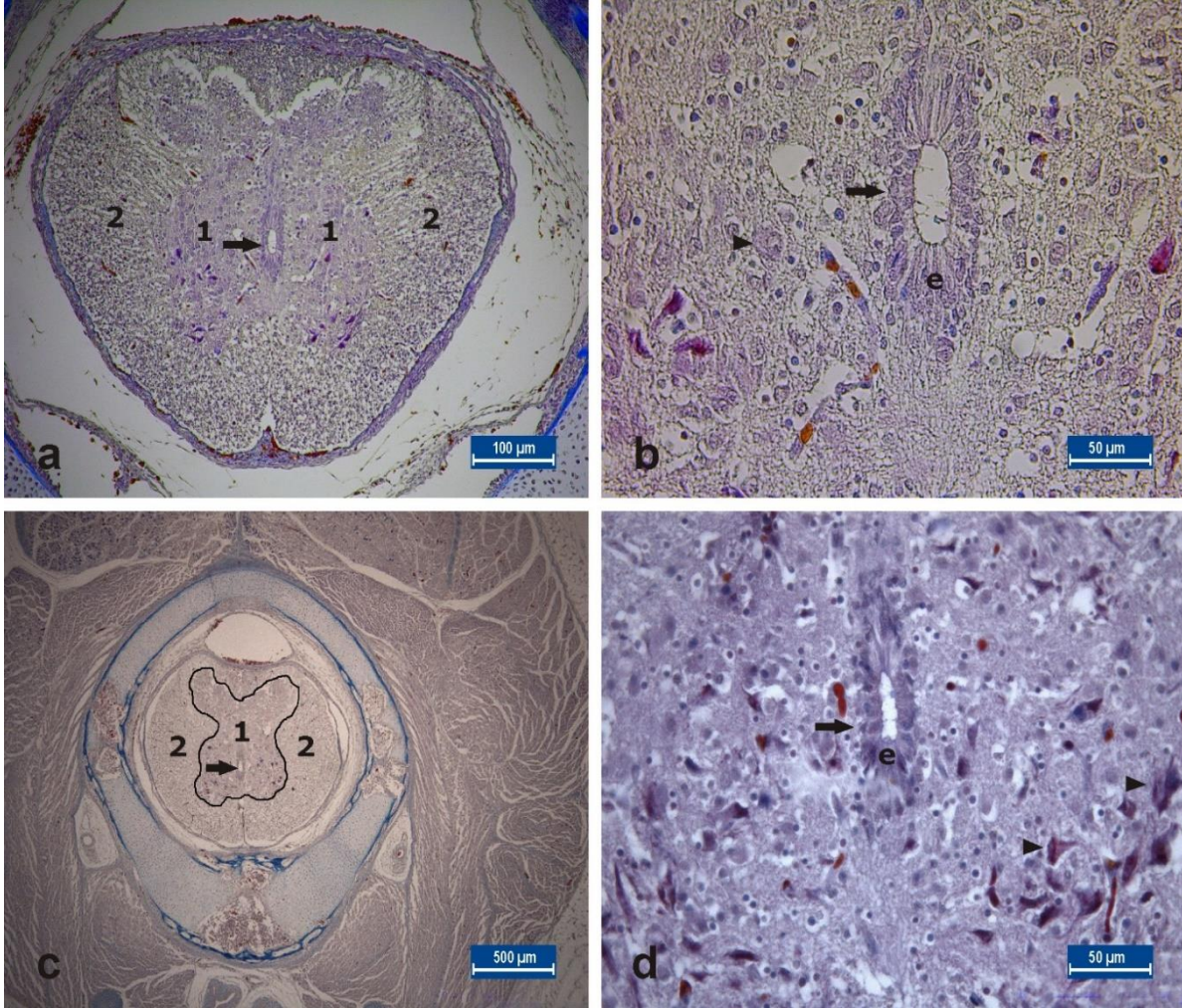
İnkübasyonun 15. günü

Bu dönemde tüm gruplarda medulla spinalis'in servikal segmentinden alınan kesitlerde ortada klasik "kelebek" şeklindeki görünümü ile substantia grisea bölgesi ve bunu çevreleyen substantia alba katmanı dikkati çekti (Şekil 2a, c). Ventral kornu'da yer alan motorik hücreler diğer hücrelerden ayırt edilebilmekteydi. Yuvarlak-oval biçimdeki kanalis sentralisin içini kübikten prizmatığe kadar değişen şekillerde ependim hücrelerinin döşediği görüldü (Şekil 2b, d).

Administered monosodium glutamate

Yapılan histometrik ölçümler sonucunda substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranı dikkate alındığında kontrol ve MSG grupları arasında önemli bir farklılık

olmadığı tespit edildi (Tablo 1). Bununla birlikte MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının azaldığı dikkati çekti ($p<0,05$, Tablo 2).



Şekil 2. Kuluçkanın on beşinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b). Kuluçkanın on beşinci günü 1,2 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Okbaşları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Üçlü boyama.

Tablo 1. İnkübasyonun 15, 18 ve 21. günlerinde medulla spinalis dokusunda substantia grisea'nın kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı.

Gruplar n=6	15.gün	18.gün	21.gün
Kontrol	33,55±2,80 ^a	32,02±1,73 ^b	35,84±6,52 ^a
Distile su	31,42±2,26 ^a	32,58±2,86 ^{ab}	34,24±3,86 ^{ab}
0,12 mg/g MSG	31,92±6,63 ^a	32,40±3,72 ^{ab}	33,43±2,03 ^{ab}
0,6 mg/g MSG	34,92±2,29 ^a	35,68±4,10 ^a	29,35±3,10 ^b
1,2 mg/g MSG	33,26±3,84 ^a	32,27±1,78 ^{ab}	30,18±2,90 ^b

^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($p<0.05$).

Tablo 2. İnkübasyonun 15,18 ve 21. günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların medulla spinalis dokularında kanalis sentralislerin enine ve boyuna çap ölçümlerine ait değerler.

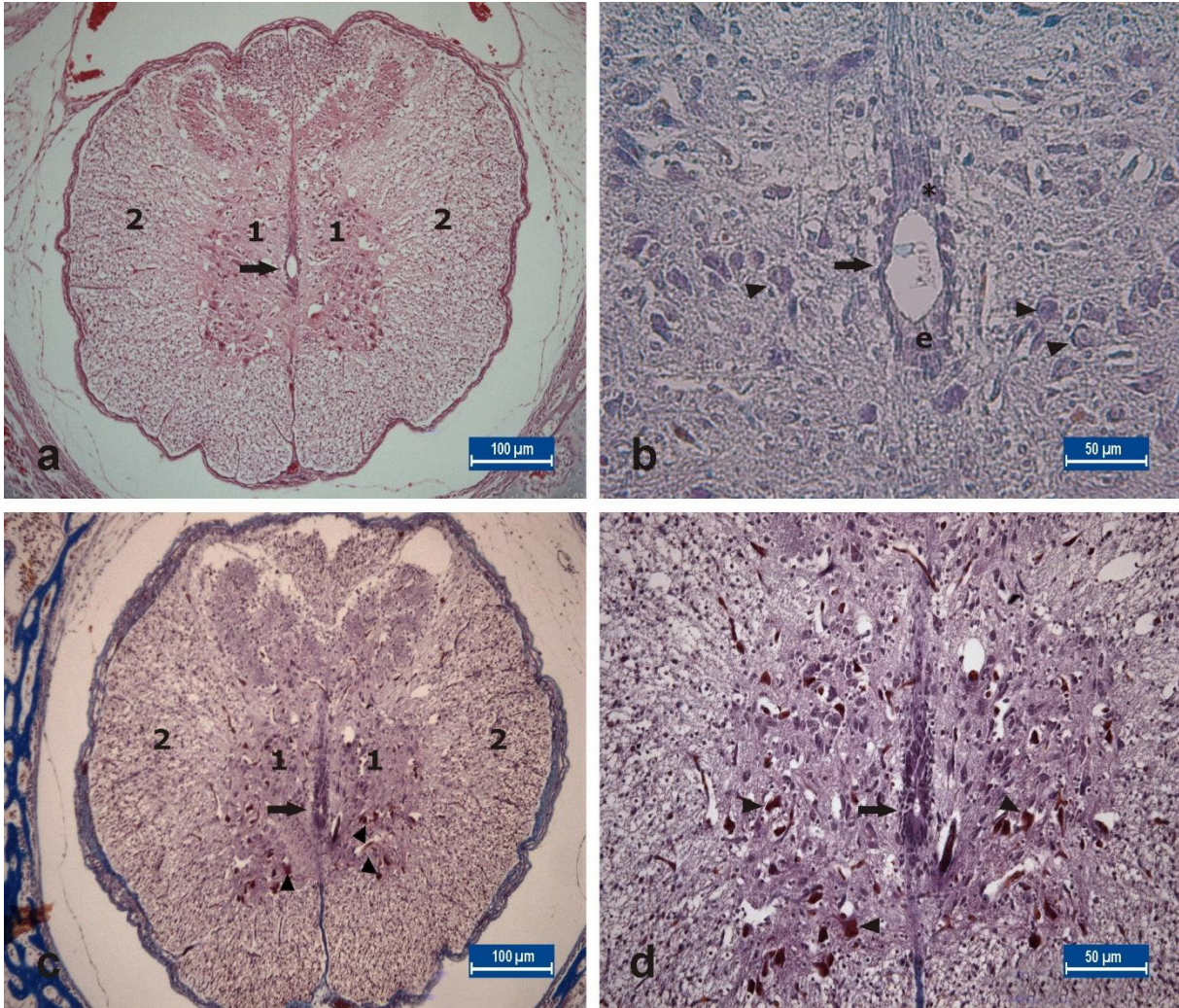
Gruplar n=6	15.gün		18.gün		21.gün	
	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)
Kontrol	19,59±4,44 ^a	33,63±3,46 ^a	18,52±2,87 ^a	35,55±6,36 ^b	36,32±3,81 ^a	59,38±6,35 ^a
Distile su	20,50±3,56 ^a	30,78±1,63 ^a	16,76±1,47 ^a	32,53±3,61 ^a	34,07±7,44 ^a	51,41±6,90 ^b
0,12 mg/g MSG	10,66±1,32 ^b	20,13±2,55 ^b	10,97±3,23 ^b	21,86±5,12 ^b	22,76±2,22 ^b	32,47±4,45 ^c
0,6 mg/g MSG	9,63±0,73 ^b	17,09±1,57 ^b	7,18±1,7 ^c	14,10±2,48 ^c	14,63±4,25 ^c	19,9±6,98 ^d
1,2 mg/g MSG	8,23±0,92 ^b	17,80±0,64 ^b	9,72±1,94 ^b	15,43±4,43 ^c	10,80±3,34 ^c	15,47±2,37 ^d

^{a-d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (p<0.05).

İnkübasyonun 18. günü

Bu dönemde tüm gruplarda bir önceki döneme kıyasla gerek substantia grisea'nın gerekse substantia alba'nın genişlediği görüldü (Şekil 3a, c). Substantia grisea yüzey alanının toplam yüzey alanına oranının 0,6 mg/g MSG

uygulanan grupta kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi (p<0.05, Tablo 1). Kanalis sentralisin enine ve boyuna çaplarının ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre azaldığı dikkati çekti (p<0.05, Tablo 2).

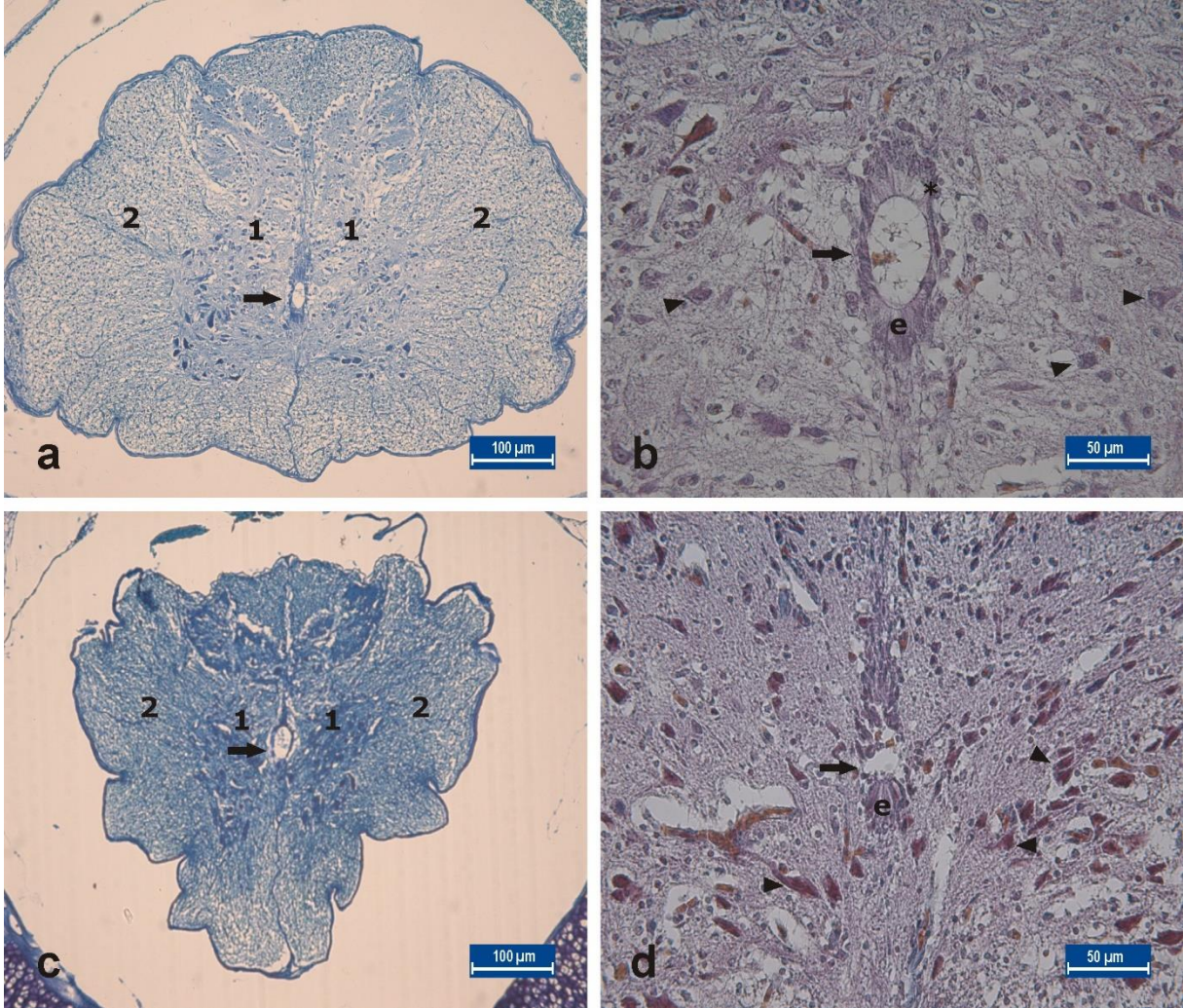


Şekil 3. Kuluçkanın on sekizinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b), H&E boyama. Kuluçkanın on sekizinci günü 0,6 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Ok başları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Üçlü boyama.

İnkübasyonun 21. günü

Kuluçkadan çıkış günü olan bu dönemde tüm gruplarda medulla spinalis'in klasik histolojik organizasyonunu hemen hemen tamamlamış olduğu dikkati çekti (Şekil 4a, c). Substantia grisea yüzey alanınının medulla spinalisin kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı 0,6 mg/g

ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 1). Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre azaldığı dikkati çekti ($p<0.05$, Tablo 2).



Şekil 4. Kuluçkanın yirmi birinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b). Kuluçkanın yirmi birinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Ok başları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Toluidine blue boyama (a, c), Üçlü boyama (b, d).

Histopatolojik Bulgular

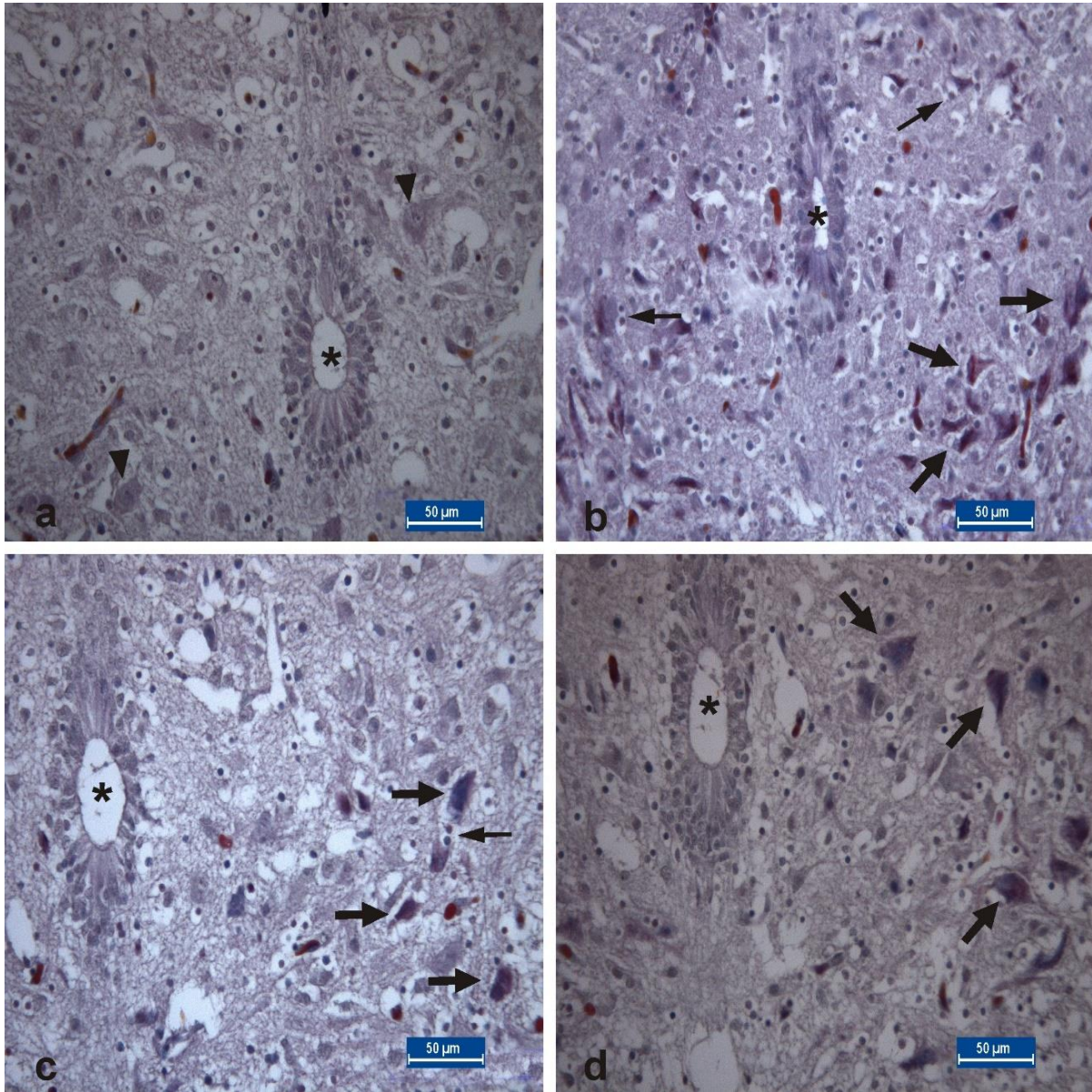
Medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda 15., 18. ve 21. günlerde nekroz ve nöronofaji gibi

histopatolojik değişikliklere rastlandı (Şekil 5b,c,d, 6b,c,d, 7b,c,d) ve kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$, Tablo 3).

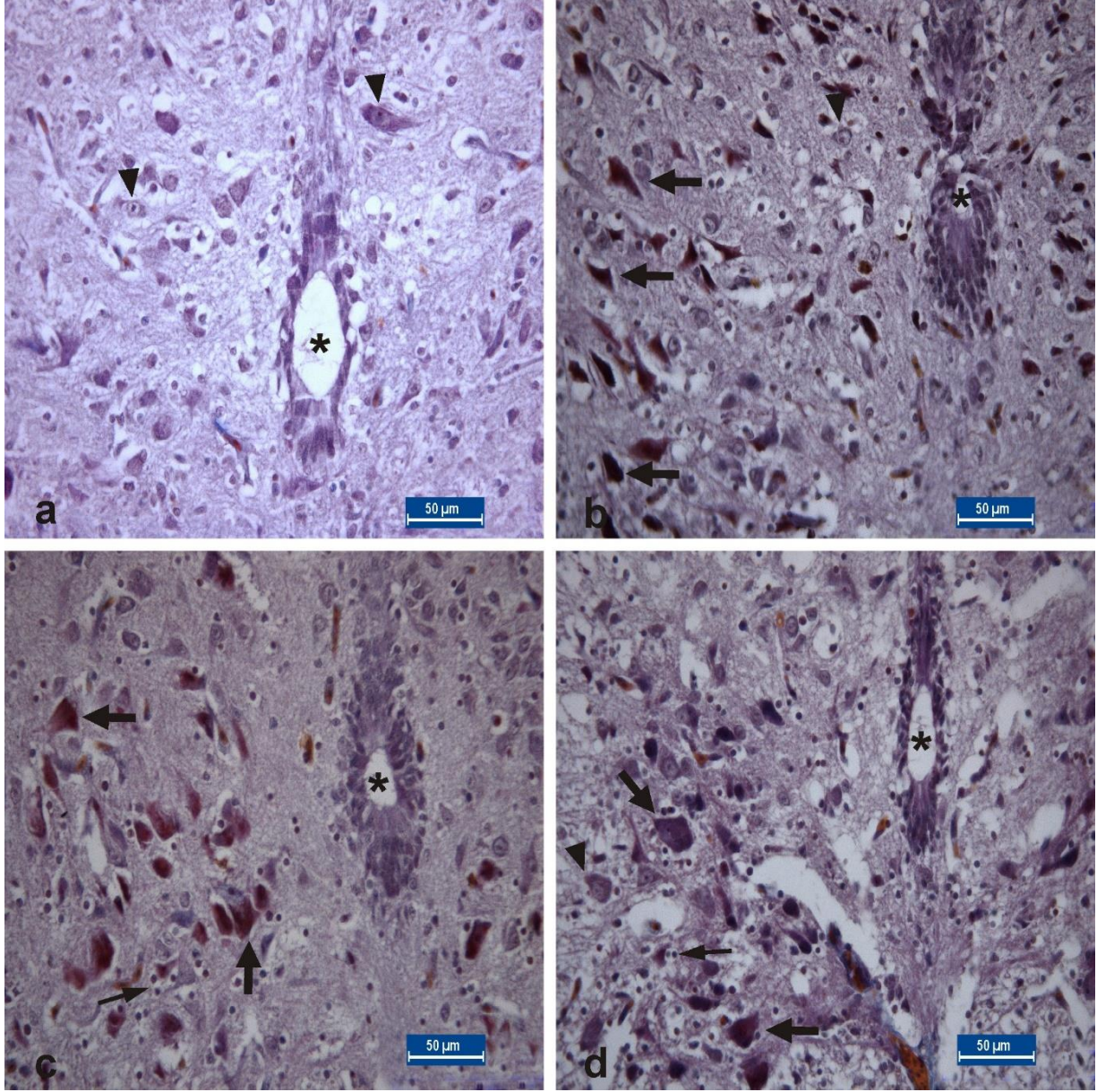
Tablo 3. İnkübasyonun 15, 18 ve 21. günlerinde medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motor nöronlarda nekrotik nöronların yüzdesi (%).

Gruplar n=6	15.gün	18.gün	21.gün
Kontrol	0,50±1,22 ^a	1,00±2,44 ^a	0,50±1,22 ^a
Distile su	2,25±2,62 ^a	3,50±2,38 ^a	2,75±3,40 ^a
0,12 mg/g MSG	17,80±1,92 ^b	25,40±2,07 ^b	22,40±3,43 ^b
0,6 mg/g MSG	21,40±2,70 ^b	39,00±3,80 ^c	35,80±1,64 ^c
1,2 mg/g MSG	22,00±3,53 ^b	38,40±5,50 ^c	33,40±2,88 ^c

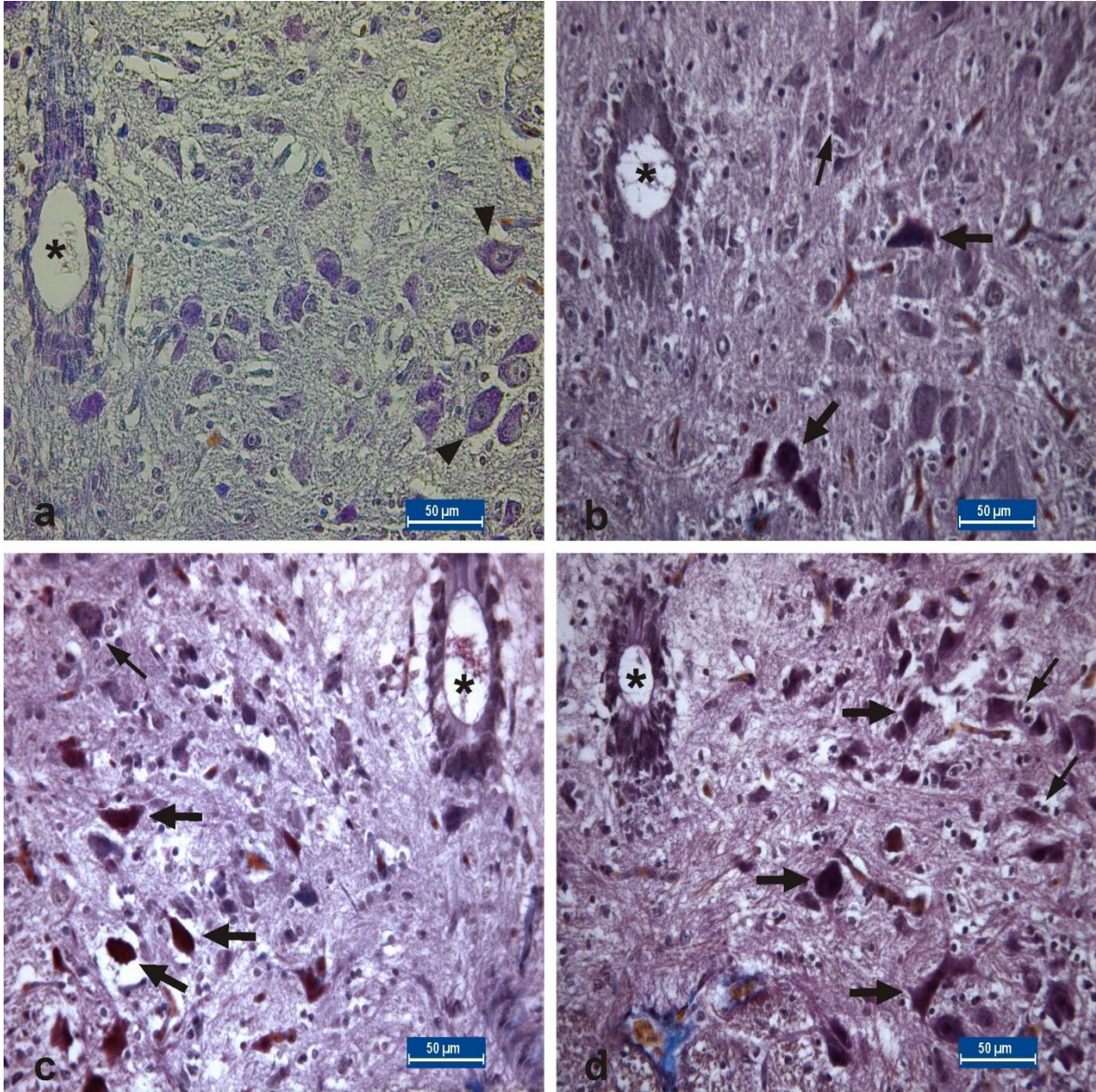
^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($p < 0.05$).



Şekil 5. Kuluçkanın on beşinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın on beşinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.



Şekil 6. Kuluçkanın on sekizinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın on sekizinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.



Şekil 7. Kuluçkanın yirmi birinci günü kontrol grubundan bir civcivin medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın yirmi birinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir civcive ait medulla spinalisin servikal segmentine ait kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.

TARTIŞMA

MSG, dünya çapında gıda endüstrisinde en çok kullanılan lezzet arttırıcı gıda katkı maddelerinden biridir (Beyreuther vd., 2007). Tüm dünyada gıdalarda MSG kullanımı hakkında süregelen bir tartışma vardır (Henry-Unaeze, 2017). MSG'nin lezzet arttırıcı gıda katkı maddesi olarak kullanımına ilişkin düzenlemeler getirilmiştir. 1971 yılında JECFA tarafından belirlenen glutamik asit ve tuzları için

kabul edilebilir günlük alım miktarı vücut ağırlığının kilogramı başına 120 mg olarak belirlenmiştir. Ancak Ağustos 2017'de Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından MSG'nin güvenilirliğinin yeniden değerlendirilmesi sonucu MSG'nin günlük alım miktarı 30 mg/kg vücut ağırlığı olarak revize edilmiştir (Nguyen vd., 2020). Gelişmiş ülkelerde ortalama MSG alımının 0,3-1,0 g/gün olduğu tahmin edilmektedir (Hajihassani vd., 2020). Ancak son yıllarda değişen yaşam tarzları

ve yeme alışkanlıkları nedeniyle işlenmiş ve paketlenmiş gıdaların tüketiminin artması, bu kimyasalların kabul edilebilir günlük alım miktarını aşma riskini arttırmıştır (Jain & Mathur, 2015).

MSG'nin plasenta bariyerine nüfuz ettiği ve embriyonik dokulara dağıldığı bildirilmiştir (Gao vd., 1994). Bu nedenle son yıllarda çalışmalar MSG'nin gelişimsel etkilerine odaklanmıştır (Al-Qudsi & Al-Jahdali, 2012; AL-Sharkawy vd., 2017). MSG'nin gebe ratlara subkutan enjeksiyonu sonucu hem gebe ratlarda hem de fetüslerinde nöronal hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Toth vd., 1987).

MSG tüketiminin sinir sistemi üzerindeki toksik etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (Abass & Abd El-Haleem, 2011; Al-Qudsi & Al-Jahdali, 2012; AL-Sharkawy vd., 2017; Dief vd., 2014; Espinar vd., 2000; Hashem vd., 2012). Abass ve Abd El-Haleem (2011), MSG'ye maruz kalan ratlarda beyin ve beyincik dokusunda; piknoz, vakuolizasyon, nörodejenerasyon, koroid pleksus tıkanıklığı, gliosis ve satellitozis gibi histopatolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Hashem vd. (2012) MSG'nin sadece sinir hücreleri üzerinde değil aynı zamanda sinir hücrelerini toksik etkilerden koruyan astrositler üzerinde de toksik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ishikawa vd. (1997) neonatal ratlarda MSG'nin öğrenme bozukluğu ile ilişkili hipokampal CA1 pramidial nöronlarda dejenerasyona neden olduğunu bildirmiştir. Khadija vd. (2009) da rasyona farklı oranlarda ilave edilen MSG'nin broiler civcivlerde orta beyinde kromatoliz, fibrolamellasyon ve gliosis ile beyincikte nöronlarda dejenerasyon ve histopatolojik lezyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Embriyonik dönemde MSG'ye maruz kalan hayvanlarda erişkinlik döneminde davranış bozuklukları gözlenmiştir (Horvath vd., 2013; Rosa vd., 2015).

Firgany ve Sarhan (2020) yaşlı ratlara MSG uygulamasının sonucunda MSG'nin kan beyin

bariyerini geçerek motor nöronlarda ve nöroglia hücrelerinde dejeneratif ve apoptotik değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Kan beyin bariyerinin henüz gelişimini tamamlamadığı yenidoğan döneminde MSG uygulamasının ratlarda farklı beyin bölgelerinde ve medulla spinaliste nöronal dejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir (Firgany & Sarhan, 2020; Kubo vd., 1993; Rivera-Carvantes vd., 2017; Rivera-Cervantes vd., 2015; Rosa vd., 2018). Al-Qudsi ve Al-Jahdali (2012) yumurtaya farklı dozlarda MSG enjekte etmiş ve inkübasyonun 7, 10 ve 14. gününde açılan yumurtalardan elde edilen tavuk embriyolarında, kontrol grubuna kıyasla MSG gruplarında embriyonik gelişme geriliği, deri altı kanama, abdominal herni, beyin deformasyonu, monoftalmi ve gaga malformasyonları gibi konjenital malformasyonlar görüldüğünü bildirmiştir. Roongruangchai vd. (2018) vitellüs kesesine farklı konsantrasyonlarda MSG'yi (1, 1.5, 2.5 ve 3 mg MSG/gm yumurta) enjekte etmiş ve MSG'nin beyin, göz, kalp ve iç organlarda büyüme geriliğine, embriyonik ölüme ve konjenital malformasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, kuluçkanın 15., 18. ve 21. günlerinde medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda nekroz ve nöronofaji gibi histopatolojik değişikliklere rastlandı. Ayrıca MSG grupları kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$).

Kanatlılarda merkezi sinir sistemi oluşumunun en erken göstergesinin kuluçkanın 16 ile 18. saatlerinde nöral plakayı oluşturan ektodermin lokal kalınlaşması olduğu bildirilmiştir. Nöral tüpün sefalik kısmı beyni oluşturmak için genişlemekte ve nöral tüpün geri kalan kısmı omuriliği meydana getirmektedir. Nöroepitel, nöroblast ve glia hücre hatlarını oluşturması yanında, beyin ventrikülüsleri ve medulla spinalisin kanalis sentralisini örten ependim hücrelerine de farklılaşır. Gelişim

ilerledikçe, spinal cord'un yanal duvarı, ince kalan dorsal ve ventral duvarlara kıyasla büyük ölçüde kalınlaşır. Bu süreçte, kanalis sentralis yanal olarak sıkıştırılır, böylece enine kesitte yanlardan basık olarak görünür (Sturkie 1986).

Brinkman ve Martin (1973), kanatlı medulla spinalisinde inkubasyonun on ikinci gününde servikal ve lumbal bölgelerin ayırt edilebildiğini, kuluçkanın on dördüncü gününde medulla spinalisin substansiya grisea bölgesinin yetişkinlerdekine benzer bir organizasyon gösterdiğini, dorsal ve ventral kornunun ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir. Necker (2005) substansiya grizeanın kuluçkadan çıkışa kadar önemli bir değişiklik göstermediğini ve servikal segmentte motor nöronların belirgin olduğunu gözlemlemiştir.

Kanatlılarda medulla spinalisin embriyonik gelişimi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. İzgi (2019), yumurtaya kuluçkanın başlangıcında 2.5, 12.5 ve 37.5 mg/kg propofol enjekte etmiş, substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranının 15, 18 ve 21. günlerde histolojik organizasyon açısından deney ve kontrol grupları arasında belirgin bir fark gözlenmemesine karşın yapılan histometrik ölçümler sonrasında bu oranın propofol enjekte edilen gruplarda embriyoların servikal segmentlerinde arttığını, torakal ve lumbal segmentlerinde ise azaldığını bildirmiştir. Araştırmacı kanalis sentralis üzerinde yaptığı histometrik ölçümler sonucunda kontrol ve deney grupları arasında kanalın enine ve boyuna çaplarının servikal, torakal ve lumbal segmentler seviyesinde farklılıklar gösterdiğini tespit etmiştir. Bu çalışmada da yapılan histometrik ölçümlerde MSG uygulanan gruplarda substantia grisea'nın kesitlerdeki toplam medulla spinalis yüzey alanına oranında 15.gün yapılan histometrik ölçümler sonucunda kontrol ve MSG grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, 18. günde özellikle 0,6 mg/g yumurta

dozunda MSG uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla arttığı, 21. günde ise 0,6 mg/g ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan grupta kontrol ve distile su grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi. Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çapları üzerinde yapılan değerlendirmelerde ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre enine ve boyuna çapların azaldığı dikkati çekti.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, MSG'nin medulla spinalisin embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymaktadır. Substantia grisea'da görülen bu değişikliklerin sonucu olarak medulla spinalis'in gerek motor gerekse duyu fonksiyonlarında ileriki dönemlerde defektlere yol açabileceği muhtemeldir. Kanalis sentralis çaplarındaki azalma temel görevi beyin ve medulla spinalis'e mekanik ve immünolojik koruma sağlamak olan beyin-omurilik sıvısının (BOS) dolaşımını da etkileyecektir. BOS'un serbest dolaşımını etkileyen faktörlerin yaşamın ilerleyen dönemlerinde ciddi fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen veriler, yumurtaya MSG enjeksiyonunun tavuk embriyosunun medulla spinalis dokusunun embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir. Gelişimin kritik bir evresi olan prenatal dönemde MSG'ye maruz kalan embriyolar sonraki yaşamlarında bazı hastalıklara daha duyarlı olabilirler.

AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (SÜVDAMEK) Etik Kurul onayı (31.05.2017 ve 2017/48) alınarak gerçekleştirilmiştir.

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

KAYNAKLAR

- Abass, M., & Abd El-Haleem, M. (2011).** Evaluation of monosodium glutamate induced neurotoxicity and nephrotoxicity in adult male albino rats. *Journal of American Science*, 7(8), 264-276.
- Al-Qudsi, F., & Al-Jahdali, A. (2012).** Effect of monosodium glutamate on chick embryo development. *Journal of American Science*, 8, 499-509.
- AL-Sharkawy, A. N., Gab-Allah, M. S., El-Mashad, A.-B. I., & Khater, D. F. (2017).** Pathological study on the effect of some food additives in male albino rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 33(2), 75-87.
- Atay, E., Ertekin, A., Bozkurt, E., & Aslan, E. (2020).** Impact of Bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. *Birth Defects Research*, 112(17), 1386-1396.
- Beas-Zárate, C., Pérez-Vega, M. A. I., & González-Burgos, I. (2002).** Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Research*, 952(2), 275-281.
- Beyreuther, K., Biesalski, H. K., Fernstrom, J. D., Grimm, P., Hammes, W. P., Heinemann, U., Kempster, O., Stehle, P., Steinhart, H., Walker, R. (2007).** Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *European journal of clinical nutrition*, 61(3), 304-313. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602526>
- Brinkman, R., & Martin, A. (1973).** A cytoarchitectonic study of the spinal cord of the domestic fowl *Gallus gallus domesticus*. I. Brachial region. *Brain Research*, 56, 43-62.
- Chambille, I., & Serviere, J. (1993).** Neurotoxic effects of neonatal injections of monosodium L-glutamate (L-MSG) on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster: Anatomical and functional consequences on the circadian system. *Journal of Comparative Neurology*, 338(1), 67-82.
- Çetin, S., & Özyayın, T. (2021).** The effects of bisphenol A given in ovo on bursa of Fabricius development and percentage of acid phosphatase positive lymphocyte in chicken. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Dief, A. E., Kamha, E. S., Baraka, A. M., & Elshorbagy, A. K. (2014).** Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. *Neurotoxicology*, 42, 76-82.
- Espinar, A., García-Oliva, A., Isorna, E. M., Quesada, A., Prada, F. A., & Guerrero, J. M. (2000).** Neuroprotection by melatonin from glutamate-induced excitotoxicity during development of the cerebellum in the chick embryo. *Journal of pineal research*, 28(2), 81-88.
- Firgany, A. E.-D. L., & Sarhan, N. R. (2020).** Quercetin mitigates monosodium glutamate-induced excitotoxicity of the spinal cord motoneurons in aged rats via p38 MAPK inhibition. *Acta Histochemica*, 122(5), 151554.
- Gad, F. A., Farouk, S. M., & Emam, M. A. (2021).** Antiapoptotic and antioxidant capacity of phytochemicals from Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and their potential effects on monosodium glutamate-induced testicular damage in rat. *Environmental science and pollution research international*, 28(2), 2379-2390. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10674-7>
- Gao, J., Wu, J., Zhao, X., Zhang, W., Zhang, Y., & Zhang, Z. (1994).** Transplacental neurotoxic effects of monosodium glutamate on structures and functions of specific brain areas of filial mice. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, 46(1), 44-51.
- Geha, R. S., Beiser, A., Ren, C., Patterson, R., Greenberger, P. A., Grammer, L. C., Ditto, A. M., Harris, K. E., Shaughnessy, M. A., Yarnold, P. R., Corren, J., Saxon, A. (2000).** Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *The Journal of nutrition*, 130(4S Suppl), 1058-1062. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1058S>
- Hajihassani, M. M., Soheili, V., Zirak, M. R., Sahebkar, A., & Shakeri, A. (2020).** Natural products as safeguards against monosodium glutamate-induced toxicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(4), 416.
- Hashem, H. E., El-Din Safwat, M. D., & Algaidi, S. (2012).** The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study). *Journal of molecular histology*, 43(2), 179-186. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9380-0>
- Hegazy, A. A., Ibrahim, I. H., Sabry, R. M., & Abass, E. S. (2017).** Effect of gestational exposure to monosodium glutamate on the structure of fetal rat lung. *Anatomy Physiol. Biochem. Int. J*, 3(2), 1-6.
- Henry-Unaeze, H. N. (2017).** Update on food safety of monosodium l-glutamate (MSG). *Pathophysiology*, 24(4), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.08.001>
- Horvath, G., Reglodi, D., Vadasz, G., Farkas, J., & Kiss, P. (2013).** Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 19054-19066.
- Ishikawa, K., Kubo, T., Shibanoki, S., Matsumoto, A., Hata, H., & Asai, S. (1997).** Hippocampal degeneration inducing impairment of learning in rats: model of dementia? *Behavioural Brain Research*, 83(1), 39-44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)86043-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)86043-3)
- İzgi, M. (2019).** Yumurta Verilen Propofol'un Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Embriyotoksik Etkilerinin Histolojik Yöntemlerle Belirlenmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Jain, A., & Mathur, P. (2015).** Evaluating hazards posed by additives in food—a review of studies adopting a risk assessment approach. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 3(3), 243-255.
- Jelinek, R. (1977).** Methods in prenatal toxicology. In: *The chick embryotoxicity screening test (CHEST)*. Eds: Neubert D, Merker H, Kwasigroch T. Stuttgart: Georg Thieme, p. 381-6.
- Kandil, B., & Sur, E. (2018).** The light microscopic investigation of the effects of in-ovo administered bisphenol A (BPA) on the development of testes. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(3), 273-281.
- Kazmi, Z., Fatima, I., Perveen, S., & Malik, S. S. (2017).** Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *International Journal of food properties*, 20(sup2), 1807-1815.
- Khadija, A., Ati, A., Mohammed, S., Saad, A., & Mohamed, H. (2009).** Response of broiler chicks to dietary monosodium glutamate. *Pakistan Veterinary Journal*, 29(4), 165-168.
- Kubo, T., Kohira, R., Okano, T., & Ishikawa, K. (1993).** Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. *Brain Res*, 616(1-2), 311-314.
- López-Pérez, S. J., Ureña-Guerrero, M. E., & Morales-Villagrán, A. (2010).** Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Research*, 1317, 246-256.
- Miko, A. M., Shehu, A. M., Bello, N., Allyu, I. A., Tasiu, I., Abdussalam A.O., & Isa, A. S. (2016).** A morphometric study of the teratogenic effect of monosodium glutamate on the developing developing cerebral cortex of Wista Rat (*Rattus norvegicus*). *Nigerian Journal of Scientific Research*, 15(3): 240-244.
- Necker, R. (2005).** Embryonic development of choline acetyltransferase and nitric oxide synthase in the spinal cord of pigeons and chickens with special reference to the superficial dorsal horn. *Anatomy and embryology*, 210(2), 145-154.
- Nguyen, L., Salanta, L.-C., Socaci, S., Tofana, M., Fărcaș, A., & Pop, C. (2020).** A Mini Review About Monosodium Glutamate. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77, 2020. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0029>
- Oladipo, I., Adebayo, E., & Kuye, O. (2015).** Effects of monosodium glutamate in ovaries of female Sprague-Dawley rats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 737-745.
- Olney, J. W. (1969).** Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719-721.
- Öznurlu, Y., Özaydın, T., Sur, E., & Özparlak, H. (2021).** The effects of in ovo administered bisphenol A on tibial growth plate histology in chicken. *Birth Defects Research doi.org/10.1002/bdr2.1925 (in press)*. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1925>
- Quines, C. B., Rosa, S. G., Da Rocha, J. T., Gai, B. M., Bortolatto, C. F., Duarte, M. M. M., & Nogueira, C. W. (2014).** Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. *Life sciences*, 107(1-2), 27-31.
- Rivera-Carvantes, M. C., Jarero-Basulto, J. J., Feria-Velasco, A. I., Beas-Zárate, C., Navarro-Meza, M., González-López, M. B., Gudiño-Cabrera, G., García-Rodríguez, J. C. (2017).** Changes in the expression level of MAPK pathway components induced by monosodium glutamate-administration produce neuronal death in the hippocampus from neonatal rats. *Neuroscience*, 365, 57-69.
- Rivera-Cervantes, M. C., Castañeda-Arellano, R., Castro-Torres, R. D., Gudiño-Cabrera, G., y Velasco, A. I. F., Camins, A., & Beas-Zárate, C. (2015).** P38 MAPK inhibition protects against glutamate neurotoxicity and modifies NMDA and AMPA receptor subunit expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(3), 596-608.
- Roongruangchai, J., Viravud, Y., Plakornkul, V., Sripaoraya, K., Boonmark, W., & Roongruangchai, K. (2018).** The Teratogenic Effects of Monosodium Glutamate (MSG) on the Development of Chick Embryos. *Siriraj Medical Journal*, 70(6), 514-522.
- Rosa, S. G., Chagas, P. M., Pesarico, A. P., & Nogueira, C. W. (2018).** Monosodium glutamate induced nociception and oxidative stress dependent on time of administration, age of rats and susceptibility of spinal cord and brain regions. *Toxicology and applied pharmacology*, 351, 64-73.
- Rosa, S. G., Quines, C. B., da Rocha, J. T., Bortolatto, C. F., Duarte, T., & Nogueira, C. W. (2015).** Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. *European journal of pharmacology*, 758, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.060>
- Sturkie P.D. (1986).** Avian Physiology. Fourth edition, Springer-Verlag New York, Inc., p. 10-15.
- Toth, L., Karcsu, S., Feledi, J., & Kreutzberg, G. (1987).** Neurotoxicity of monosodium-L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta neuropathologica*, 75(1), 16-22.
- Williams, A., & Woessner, K. (2009).** Monosodium glutamate ‘allergy’: menace or myth? *Clinical & Experimental Allergy*, 39(5), 640-646.
- Zanfirescu, A., Ungurianu, A., Tsatsakis, A. M., Nițulescu, G. M., Kouretas, D., Veskoukis, A., Tsoukalas, D., Engin, A. B., Aschner, M., Margină, D. (2019).** A Review of the Alleged Health Hazards of Monosodium Glutamate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1111-1134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12448>

Diagnosis of Avian Tuberculosis in laying hens by pathological, microbiological and polymerase chain reaction (PCR): Case report

Case Report

Orhan Yavuz^{1a}
Özgür Özdemir^{2b}
Zafer Sayın^{3c}
Fatih Hatipoğlu^{2,4d}
Hasan Hüseyin Hadimli^{3e}

ABSTRACT

Avian tuberculosis was described at 50 week-old Lohmann chickens in a commercial chicken farm. The study materials were 50 week-old 20 pieces of chicken from 2 coops and 16 week-old 20 pieces of pullets from 4 coops in a commercial chicken farm. After necropsy, samples were processed routinely for histopathological and microbiological examinations. Macroscopically, hard consistency, numerous and different sizes, whitish-yellow caseificated-calcificated nodules were seen on the liver, spleen, kidneys and intestinal serosa. In the microscopic examination, various sized granulomas, which have been caseification necrosis surrounded by epithelioid histiocytes and multinucleated giant cells, were found at liver, spleen, wall and serosa of intestine. Numerous acid-fast bacteria were seen on histopathology at necrosis and macrophages in the liver, spleen and the intestines by Ziehl – Neelsen staining in all cases. *Mycobacterium avium* spp was produced at microbiological inoculations in liver, spleen, intestines and ovaries. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* from these cultures was identified by PCR. It was thought that infection could be by fecal-oral route due to both intestinal tuberculosis in hens and common disease in coop. Therefore, the role of chicken manure may also be taken into account for the spreading of the disease.

Keywords: Hens, Mycobacteriosis, Pathology, PCR

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray
²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya
³Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya
⁴Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kyrgyzstan-Turkey Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

ORCID-

^a[0000-0002-8075-9564](https://orcid.org/0000-0002-8075-9564)

^b[0000-0002-1595-0557](https://orcid.org/0000-0002-1595-0557)

^c[0000-0001-6096-4440](https://orcid.org/0000-0001-6096-4440)

^d[0000-0002-0103-5868](https://orcid.org/0000-0002-0103-5868)

^e[0000-0002-7665-687X](https://orcid.org/0000-0002-7665-687X)

Correspondence

Orhan YAVUZ

vetorhanyavuz@gmail.com

Article info

Submission: 31-05-2021

Accepted: 07-11-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



INTRODUCTION

Avian tuberculosis is a chronic infectious disease characterized by low productivity and weakening caused by *Mycobacterium avium* (MA) (Fulton and Thoen, 2003; Jordan and Hampson, 2008). The disease has caused major losses to hen populations. It is not only seen predominantly in laying hens, but has also been detected in pigeons, turkeys, parrots, pheasants, waterfowl and wild birds (Bolfion et al., 2010; Cromie et al., 1993; Gonzalez et al., 2002; Gümüşsoy et al., 2006; Kapakin and Alçıgır, 2009; Keymer et al., 1982; Kriz et al., 2010; Kul et al., 2005; Kutsal and Sağlam, 1988; Mayahi et al., 2013; Prukner-Radovic et al., 1998; Saggese et al., 2007; Sezen et al., 1986; Sousa et al., 2008). Transmission is carried with digestion of contaminated feed and water. It has been reported that inhalation is not an effective method of contracting the infection (Fulton and Thoen, 2003). MA can be isolated from the egg in a natural infection, but it failed to create avian tuberculosis in hatched chicks. The agents die after boiling of eggs for 6 minutes (Fulton and Thoen, 2003). The most common symptom is increasing weakening of sick birds. Greenish diarrhea and deaths occur in the chronic period.

How to cite this article

Yavuz, O., Özdemir, Ö., Sayın Z., Hatipoğlu, F., Hadimli, HH. (2021). Diagnosis of Avian Tuberculosis in laying hens by pathological, microbiological and polymerase chain reaction (PCR): Case report. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 312-317. <https://doi.org/10.31797/vetbio.935334>

The most affected organs are liver, spleen, intestine, bone marrow and lung. Numerous large and small, hard structured, whitish-yellow nodules are observed in affected organs during the necropsy. There are typical tubercles in microscopic examination (Fulton and Thoen, 2003). A large number of acid-fast bacteria can observe by Ziehl – Neelsen (ZN) staining. Diagnosis of avian tuberculosis in hens depends on the demonstration of MA in live or dead chickens, tuberculin test or serological and PCR techniques (OIE, 2014). MA causes zoonotic infections in humans especially in immunocompromised individuals such as leukemia patients or infected with HIV. MA can lead to generalized mycobacteriosis in such humans, but healthy humans have a low susceptibility to MA infection (Coelho et al., 2013).

CASE DESCRIPTION

In this study, an outbreak of avian tuberculosis was identified on a commercial chicken farm by clinical, pathological findings and PCR techniques. The study materials were 20 pieces of 50-week-old chickens from two coops and 20 pieces of 16-week-old pullets from four coops in a commercial chicken farm with 400 thousand chicken capacity in Turkey. All animals were brought dead. The farm exhibited fine biosecurity conditions and hens fed with commercial feed. Diets have also included meat and bone meal. An increase in number of deaths (up to 3%) was observed over 2 months period in the farm. Clinically, weakening and decrease of egg production were noticed in hens and pullets. The rate of egg production was decreased to 80% from 100% in the farm.

All chickens were necropsied and examined grossly. Tissue samples were fixed in 10% formalin for 24 hours and processed routinely, then embedding in paraffin. Embedded tissue samples were cut at 5µm thick and stained with

Hematoxylin & Eosin (HE) and ZN and examined with light microscope. Smears were stained with ZN for cytological examination.

Samples were inoculated into Lowenstein-Jensen culture medium for microbiological examination. Isolation and identification of *Mycobacterium avium subsp. avium* (MAA) isolates were made using the protocol described by Ambrosio et al. (2008). Specimens were cultured on Lowenstein-Jensen medium at 37°C for 6 weeks and isolates were stored at -80°C. Chromosomal DNA of MAA was extracted using the protocol provided in Promega Wizard Genomic DNA purification Kit (Cat No: A1120). The DNA samples were stored at -20°C until used as templates for amplification. MAA specific primer pairs were used in polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the insertion sequence IS901 of MAA as described by Kunze et al. (1991). The sequence of forward primer was 5'- GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA-3' and reverse primer was 5'-TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT-3'. Specific primers showed a single amplicon of 1108 bp. The extracted DNA was amplified in a total volume of 50 µL (5 µL 10× PCR buffer, 250 mM from each dNTPs (MBI Fermentas), 1.25 U taq polymerase (MBI Fermentas), 0.5 µM each of primers (IDT), 1.5 mM MgCl₂, and 5 µL extracted DNA. The cycling conditions with the Techne Progene (Cambridge Ltd., UK) were the initiation step at 94 °C for 3 min, followed by 33 cycles coupling 94 °C for 1 min, 66 °C for 45 s and 72 °C for 4 min and a final extension period at 72 °C for 3 min (14). Ten µL of amplification products were submitted to electrophoresis in 2% agarose gel in Tris–borate EDTA buffer and the 100 bp ladder DNA marker (MBI Fermentas) was run concurrently. The ethidium bromide-stained DNA bands were visualized and the gel photographed.

There was no difference in terms of lesion location and severity between 16 and 50 week

old hens in the farm. Macroscopically, a great number of large and small, hard consistency, whitish-yellow, calcified cut surfaces of nodules

were found in the liver (Figure 1A.), spleen (Figure 1B.), kidneys, serosa of the intestines (Figure 1C.) and ovaries (Figure 1D.).

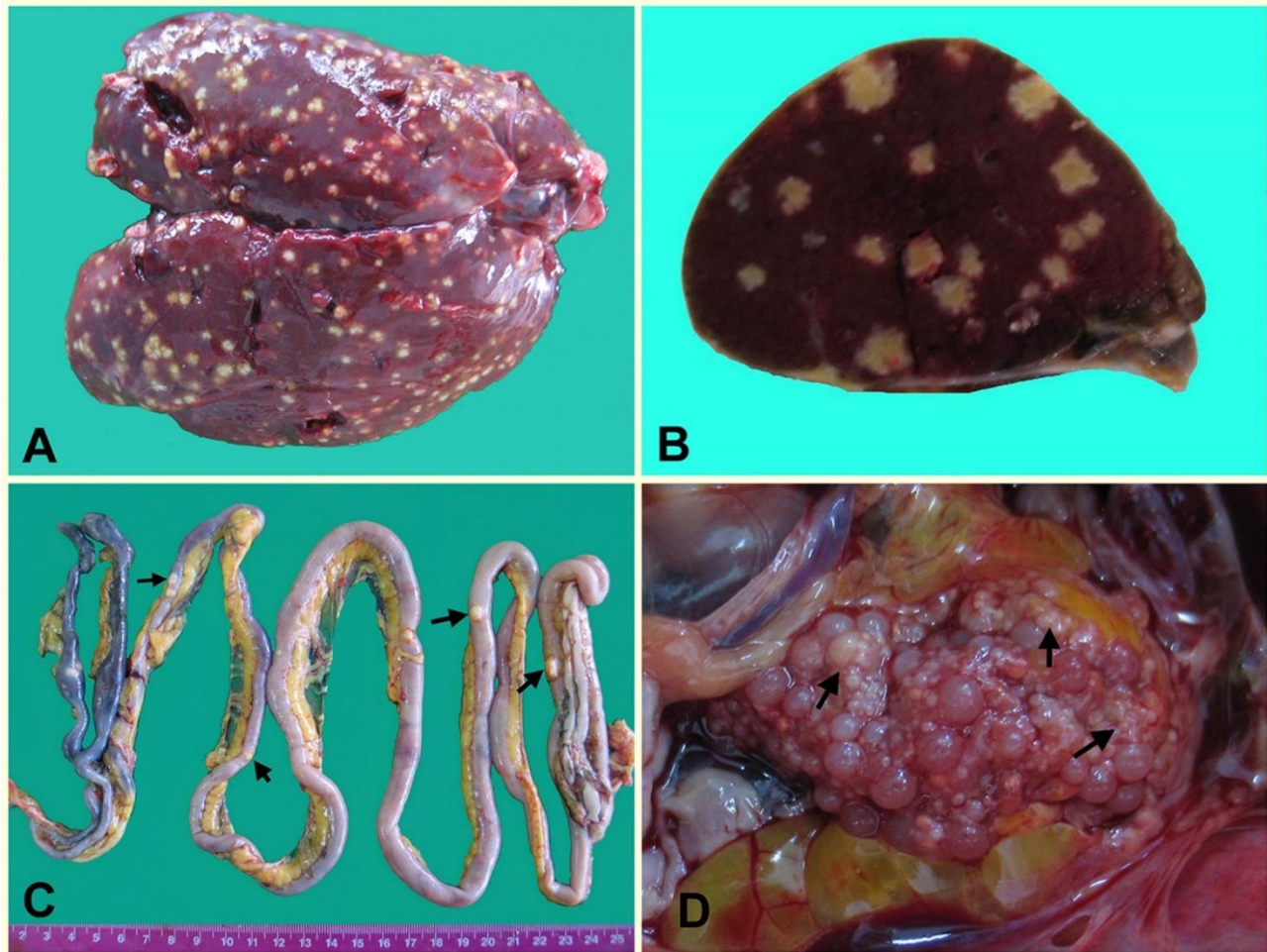


Figure 1. A. A great number of large and small, hard structured, whitish-yellow tubercles in the liver. B. Cut surfaces of spleen. C. Serosa of the intestines (arrows). D. Ovaries (arrows)

Various sized granulomas (Figure 2A.), which have been identified as caseification necrosis surrounded by epithelioid histiocytes and multinucleated giant cells (Figure 2B.), were found in liver, spleen, wall and serosa of intestine at microscopical examination. It was noticed that granulomas in the serosa caused ulcers when it came to mucosa. Numerous acid-fast bacteria were determined at necrosis areas by cytological smears (Figure 2C.) and histopathology, as well as macrophages in the liver, spleen and intestines by ZN staining. The agent was identified as a MAA by PCR analysis on microbiological inoculations of liver, spleen, intestines, lung and ovaries (Figure 2D.). There were no findings related to tuberculosis in the other coops of same farm.

DISCUSSION

It has been reported that MA infection is commonly observed in pigeons, captive pets and wild birds in the zoo (Bolfion et al., 2010; Gümüşsoy et al., 2006; Kapakin and Alçıgır, 2009; Kriz et al., 2010; Mayahi et al., 2013; Prukner-Radovic et al., 1998; Sezen et al., 1986; Sousa et al., 2008). However, rarely are outbreaks observed on commercial chicken farms under inadequate hygiene conditions (Gonzalez et al., 2002). Atypical symptoms such as chronic period of disease, cachexia, muscle atrophy and decreased egg production complicates the clinical diagnosis. In such cases, pathological findings are helpful for diagnosis as

well as identification of agents by advanced molecular techniques (OIE 2014).

Gonzalez et al. (2002) mentioned two different models for disease as clinical and pathologically. In the first type generalized tuberculosis was observed as a result of cachexia and decreased productivity. Secondly, there were limited infraorbital sinus lesions and no loss of egg production. Clinically, cachexia, weight loss and decreased egg production have been observed in our case. Grossly generalized tuberculosis lesions were observed on internal organs such as the liver, spleen and intestines

with no evidence of macroscopic lesions in infraorbital sinuses and the lungs. This situation was interpreted as primarily lesions occurring in organs such as the liver and intestines due to oral transmission.

The agents were identified in the liver, spleen, intestines, ovary and the lungs by PCR analysis with IS 901 primer. Despite there being no macroscopic or microscopic findings in the lungs, MAA was identified by PCR. Thus, it is thought to be the causative agent generalized to the lungs from the digestive organs.

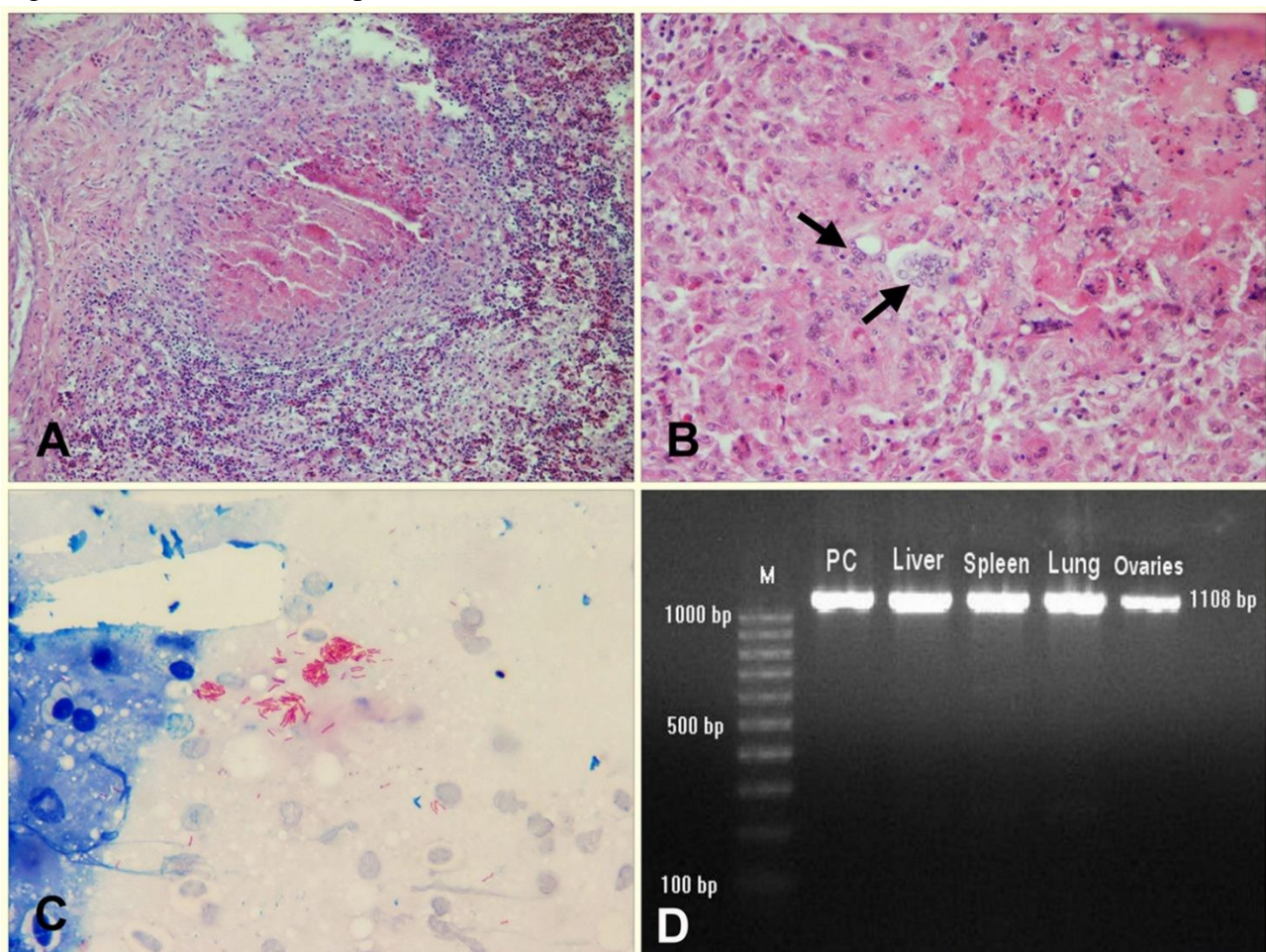


Figure 2. A. Caseified tubercles which have been surrounded by mononuclear, epithelioid and giant cells, **Spleen**, x200, HE, B. Multinucleotid giant cells in the granulomas (arrows), **Liver**, x400, HE, C. Acid-fast bacteria in the cytological examinations, **Liver**, x1000, ZN, D. The image of agarose gel electrophoresis of the MAA culture positive samples by IS 901 primer (**M**: Fermentas 100 bp DNA marker SM 0321, **PC**: Positive control- *M. Avium* ATCC 25291).

Mycobacterium avium can be isolated from the egg in natural infection, however the hatched chickens failed to develop avian tuberculosis (Fulton and Thoen, 2003). Although the MA were isolated and identified from the ovaries of

infected animals, there was no causative agent detected from eggs of these hens. It has been expressed that *Mycobacterium avium* are not always identified from eggs. They may vary with

intensity and severity of the infection (Shitaye et al., 2008).

Although Fulton and Thoen (2003) reported to avian tuberculosis is less prevalent in young chickens, extensive and diffuse tuberculosis was observed in this case report. The occurrence of fecal-oral contamination due to a large amount of agents entering to the body via oral route and the presence of lesions in the intestines have shown that increase the prevalence of the disease in the farm. The presence of extensive intestinal lesions in these hens supports this possibility. Besides, recently informed from farm veterinarian that the meat and bone meal join to the diet, raised concerns about feeding. Therefore, it has been expressed that such hens are an important source of spreading the disease. It was estimated that hens might be infected with tuberculosis orally from feces, because Hejlícek and Treml (1995) emphasized that the contaminated feces of infected birds are the major source of infection for other hens.

In conclusion, it was thought that infection could have been by fecal-oral route due to the presence of intestinal tuberculosis in hens. Therefore, the role of chicken manure may also be taken into account for the spreading of the disease.

ACKNOWLEDGMENT

It was presented as a poster presentation in the VI. National Veterinary Pathology Congress.

Ethical approval: Procedures performed with dead animals or their tissues, slaughterhouse materials and waste fetuses are not subject to the permission of the Animal Experiments Local Ethics Committee”.

Conflict of interest: The authors declared that there is no conflict of interest

KAYNAKLAR

- Ambrosio, S.R., Márcia De Deus, O.E., Rodriguez, C.A.R., Neto, J.S.F., & Amaku, M. (2008). Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 241-4.
- Bolfion, M., Salehi, M., Ashrafi, H.J., Soleimani, K., Keshavarz, R., Aref, P.R., Mohammad, T.M., Tadayon, K., & Mosavari, N. (2010). Outbreak of avian Mycobacteriosis in flocks of domestic pigeons: an epidemiological approach. *Iranian Journal of Microbiology*, 2, 189-93.
- Coelho, A.C., Pinto, M.L., Matos, A., Matos, M., & Pires, M.A. (2013). Mycobacterium avium complex in domestic and wild animals. In: R.P. Carreira (Eds). *Insights from Veterinary Medicine* (pp. 91-128). Rijeka: InTech Publishing. <https://doi.org/10.5772/56196>
- Cromie, R.L., Brown, M.C., Forbes, N.A., Morgan, J., & Stanford, J.L. (1993). A comparison and evaluation of techniques for diagnosis of Avian Tuberculosis in wildfowl. *Avian Pathology*, 22, 617-30.
- Fulton, M.R., & Thoen, C.O. (2003). Tuberculosis. In: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (Eds). *Diseases of poultry. 11th ed.* (pp. 836-844). Iowa State University Press.
- Gonzalez, M., Rodriguez, A.B., Gimeno, I., Flores, J.M., & Pizarro, M. (2002). Outbreak of avian Tuberculosis in 48 week-old commercial layer hen flock. *Avian Disease*, 46, 1055-61.
- Gümüşsoy, K.S., Beyaz, L., Aydin, F., Özcan, M., & Atasever, A. (2006). Avian Tuberculosis in Kayseri zoo. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3, 25-8.
- Hejlícek, K., & Treml F. (1995). Comparison of pathogenesis and epizootiology signification of avian mycobacteriosis in different sorts of domestic and free living synanthropic fowl. *Veterinárni Medicina*, 40, 187-94.
- Jordan, F.T.W., & Hampson, D.J. (2008). Mycobacterium Avium – Avian Tuberculosis. In: M. Pattison, P.F. McMullin, D.J. Alexander (Eds). *Poultry disease. 8th ed.* (pp. 250-254). Saunders Elsevier Press.
- Kapakin, K.A.T., & Alçıgır, G. (2009). The case of Tuberculosis in a pigeon. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 477-9.
- Keymer, I.F., Jones, D.M., Pugsley, S.L., Wadsworth, P.F. (1982). A survey of tuberculosis in birds in the regent's park gardens of the zoological society of London. *Avian Pathology*, 11, 563-9.
- Kriz, P., Slana, I., Mrlik, V., Moravkova, M., Kralova, A., Krizova, K., & Pavlik, I. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*) diagnosed by direct conventional multiplex PCR: a case report. *Veterinárni Medicina*, 55, 87-90.
- Kul, O., Tunca, R., Hazıroğlu, R., Diker, K.S., & Karahan, S. (2005). An outbreak of avian Tuberculosis in peafowl (*Pavo cristatus*) and pheasants (*Phasianus colchicus*) in a zoological aviary in Turkey. *Veterinárni Medicina*, 50, 446-50.

- Kunze, Z.M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M.T., Portaels, F., & Mcfadden, J.J. (1991).** IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Molecular Microbiology*, 9, 2265-72.
- Kutsal, O., & Sağlam, M. (1988).** Güvercinlerde tüberküloz olgularının değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 35, 545-52.
- Mayahi, M., Mosavari, N., Esmacilzadeh, S., & Asadollahi, K.P. (2013).** Avian Tuberculosis in naturally infected lofts of domestic pigeons, isolation, molecular identification and study of necropsy findings. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 11, 194-201.
- OIE. (2014, December 20).** Avian Tuberculosis. *OIE Terrestrial Manual 2014. Chapter 2.3.6.* http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.06_AVIAN_TB.pdf
- Prukner-Radovic, E., Culjak, K., Sostaric, B., Mazija, H., & Sabocanec, R. (1998).** Generalized Tuberculosis in pheasants at a commercial breeding farm. *European Journal of Wildlife Research*, 44, 33-9.
- Saggese, M.D., Riggs, G., Tizard, I., Bratton, G., Taylor, R., & Phalen, D.N. (2007).** Gross and microscopic findings and investigation of the aetiopathogenesis of mycobacteriosis in a captive population of white-winged ducks (*Cairina scutulata*). *Avian Pathology*, 36, 415-22.
- Sezen, Y., Erer, H., & Erganiş, O. (1986).** Bir güvercinde tüberküloz olgusu. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 2, 163-6.
- Shitaye, J.E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, M., Dvorska, L., Trcka, I., Lamka, J., Treml, F., Vrbas, V., & Pavlik, I. (2008).** Diagnostic testing of different stages of avian Tuberculosis in naturally infected hens (*Gallus domesticus*) by the tuberculin skin and rapid agglutination tests, faecal and egg examinations. *Veterinárni Medicina*, 53, 101-10.
- Sousa, E., Momo, C., Costa, T.P., Pinheiro, S., & Werther, K. (2008).** Disseminated avian Tuberculosis in captive *Ara macao*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 1, 28-31.

Astaksantin'in kimyası ve uygulamaları üzerine bir inceleme

A review of astaxantine's chemistry and its applications

ÖZET

Doğal bir antioksidan olan Astaksantin Su ürünleri yetiştiriciliğinde, ete pembe renk özelliğini sağlamak için alabalık ve kabuklu su ürünleri üretiminde yaygın olarak kullanılan bir karotenoiddir. Bu uygulama doksanlı yıllardan bu yana otuz yılı aşkın bir süredir kullanılmakla birlikte günümüzde gıda renk maddeleri endüstrisinde en önemli pigmentlerden biridir. Ek olarak, astaksantin balıkların üreme süreçlerinde yumurta ve sperm kalitesinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır. Dünya pazarına ağırlıklı olarak sentetik astaksantin kullanımı hâkim olmakla birlikte, pigmentin doğal kaynaklarına olan ilgi son zamanlarda büyük ölçüde artmıştır. Doğal astaksantin en yaygın kaynakları kabuklu yan ürünlerinin yanı sıra yeşil alglerden *Haematococcus pluvialis*, kırmızı maya *Phaffia rhodozyma*'dır. Astaksantin, kapsüllenmiş ürün olarak nutrasötik pazarında talep artışına sahip olan bir antioksidandır. Ayrıca, astaksantin tüketiminin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, *Helicobacter pylori*'ye karşı biyoaktivite ve kataraktın önlenmesi gibi insan sağlığı yönünden birçok yararı olduğu bildirilmektedir. Bu makale, astaksantin pigmentinin kimyası ve canlılar üzerine potansiyel yararlı etkileri ile ilgili mevcut kanıtları gözden geçirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astaksantin, antioksidanlar, karotenoidler

ABSTRACT

Astaxanthin, a natural antioxidant, is a carotenoid widely used in aquaculture, in the production of trout and shellfish to provide the pink color of meat. Although this application has been used for over thirty years since the nineties, it is one of the most important pigments for food colouring industry today. Additionally, astaxanthin plays an important role in improving egg and sperm quality in fish reproductive processes. The world market is dominated by the use of synthetic astaxanthin, besides, interest in natural sources of the pigment has grown considerably recently. The most common sources of natural astaxanthin are the green algae *Haematococcus pluvialis*, the red yeast *Phaffia rhodozyma*, as well as crustacean byproducts. Astaxanthin is an antioxidant that has increased demand in the nutraceutical market as an encapsulated product. In addition, the consumption of astaxanthin has many health benefits, such as the prevention of cardiovascular diseases, strengthening the immune system, bioactivity against *Helicobacter pylori*, and prevention of cataracts. This article reviews the available evidence on astaxanthin chemistry and its potential beneficial effects on living things.

Keywords: Astaxanthin, antioxidants, carotenoids

Review Article

Çiğdem Dikel

Cukurova University,
Adana, Turkey

ORCID-

[0000-0002-5533-8899](https://orcid.org/0000-0002-5533-8899)

Correspondence

Çiğdem DİKEL

atlasdikel01@gmail.com

Article info

Submission: 28-06-2021

Accepted: 07-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution

4.0 International License



How to cite this article

Dikel, C. (2021). A review of astaxantine's chemistry and its applications. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 318-330. <https://doi.org/10.31797/vetbio.958582>

GİRİŞ

Son on yılda, deniz organizmalarında ilginç farmasötik aktivitelere sahip çok sayıda madde tanımlanmıştır.

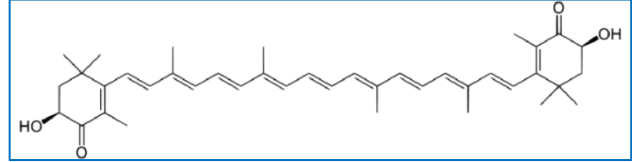
Deniz ortamlarının çeşitliliği, önemli bir biyoaktif bileşik kaynağı sağlamaktadır. Bu, hücrel redoks durumu değişiklikleri ile karakterize edilen birçok hastalığa karşı terapötik stratejide etkinlik ve düşük toksisite ile doğal kaynaklı potansiyel yeni ilaç adaylarına yol göstermektedir. Doğal antioksidan maddeler aracılığıyla beslenme yaklaşımı, kardiyovasküler hastalıkların hem önlenmesinde hem de tedavisinde önemli bir yeni çizgiyi temsil eder. Bilimsel kanıtlar, bazı inflamatuvar ve kronik hastalıklara karşı fitokimyasalların yararlı rollerini desteklemektedir. Doğal olarak oluşan birkaç antioksidan biyoaktif madde, bunların önlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Gammone vd., 2015).

Büyük antioksidan özelliklere sahip birçok karotenoid, hem epidemiyolojik çalışmalarda hem de insanlarda besin takviyesi denemelerinde bir risk azalması sergilemiş, bu da oksidatif stres, proinflamatuvar bir sistemik ortam ve çok sayıda kronik hastalık arasında güçlü bir bağlantının varlığını göstermiştir (D’Orazio, vd., 2012). Sonuç olarak, beslenme iyileştirmesi, insan sağlığını daha iyi bir yaşam kalitesi kadar morbidite ve mortalitenin azalmasına doğru kaydırabilmektedir.

Astaksantin, tetraterpenoidler olarak bilinen fitokimyasallar sınıfına ait olan ve sekiz izopren, C₅H₈ molekülünden oluşan bir karotenoiddir; ilk öncü olarak izopentenil difosfat (veya IPP) ve dimetilalil difosfat (veya DMAPP) (Şekil 1). Birçok karotenoid gibi, astaksantin renkli ve lipitte çözünürlüğe sahip pigmenttir. Astaksantin rengi, bileşiğin merkezindeki genişletilmiş konjuge (dönüşümlü çift ve tek)

çift bağ zincirinden kaynaklanmaktadır (Choi vd., 2005).

Bu karotenoidler sadece harika doğal renkler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda oksidatif stresi hafifletmek için antioksidan olarak biyolojik açıdan önemli rol oynamaktadır (Krinsky 1994).



Şekil 1. Astaksantin Moleküler yapısı (Gammone vd., 2015)

Olağanüstü antioksidan aktivitesi nedeniyle Astaksantin, organizmayı kardiyovasküler problemler, farklı kanser türleri ve bazı immünolojik sistem hastalıkları gibi çeşitli rahatsızlıklara karşı korumak için üstün bir potansiyele sahiptir. Bu dikkat çekici özellikler, Astaksantin'e büyük ilgi uyandırarak insanlara ve hayvanlara potansiyel faydaları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmasına yol açmaktadır. Günümüzde dünya pazarlarının çoğunu kapsayan sentetik pigmente alternatif olarak doğal Astaksantin kaynaklarının (alg, maya ve kabuklu yan ürünleri) tanımlanması, üretimi ve kullanımına da odaklanılmaktadır. Bu derleme, bu doğal bileşenin önemine dair güncellenmiş çalışmalara, genel bir bakış açısı sağlamayı amaçlamaktadır.

ASTAKSANTİN KAYNAKLARI

Sentetik astaksantin

Sentetik Astaksantin, canlı organizmalarda üretilenle aynı moleküldür ve sırasıyla 1: 2: 1 izomer (3S, 3S'), (3R, 3S') ve (3R, 3R) karışımından oluşmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde dünya çapında kullanılan ana karotenoiddir. Roche firması, 1990 yılında büyük ölçekli sentetik Astaksantin üretimine başladı ve Astaksantin pigmentin dünya pazarındaki değerinin 150-200 milyon

dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, doğal gıdalara talebin artması ve sentetik pigmentlerin yüksek maliyeti, sanayileşme potansiyeli olan doğal Astaksantin kaynaklarına yönelimi teşvik etmektedir.

Astaksantin'in doğal kaynakları

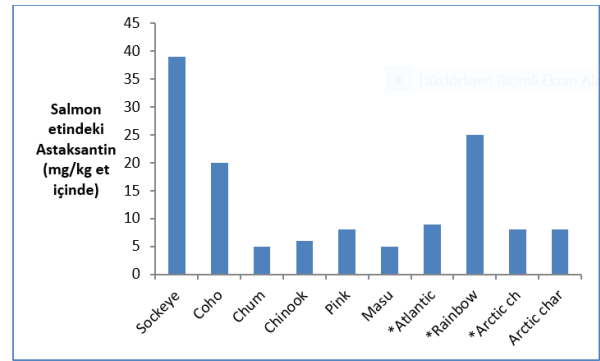
Astaksantin doğal kaynakları yosun, maya, somon, mollusk, alabalık, kril, karides ve kerevittir (Catanzaro vd., 2020). Çeşitli mikroorganizma kaynaklarından elde edilen astaksantin, Tablo 1. de verilmiştir. Ticari astaksantin esas olarak *Phaffia* mayası, *Haematococcus*'tan ve kimyasal sentez yoluyla elde edilir. *Haematococcus pluvialis*, doğal astaksantin en iyi kaynaklarından biridir (Lorenz 1999; EFSA 2005; Ranga Rao vd., 2009; Ranga Rao vd., 2010).

Doğadaki ve çiftlik alabalıklarındaki astaksantin içeriği Şekil 1'de verilmiştir. Yabani salmonidler arasında, yabani *Oncorhynchus* türlerindeki maksimum astaksantin içeriği, sockeye salmonunda 26-38 mg / kg et aralığında bildirilirken, düşük astaksantin içeriği chum salmonunda bildirilmiştir (EFSA 2005). Yetiştirilmiş Atlantik salmonundaki astaksantin içeriği 6–8 mg / kg et olarak rapor edilmiştir. Astaksantin, Avrupa alabalıklarında (6 mg / kg et) ve Japon pazarındaki alabalıklarda (25 mg / kg et) mevcuttur. Karides, yengeç ve somon, astaksantin için diyet kaynakları olarak hizmet edebilir (EFSA 2005). Doğadan yakalanmış somon, iyi bir astaksantin kaynağıdır. 3,6 mg astaksantin elde etmek için günde 165 gram somon balığı tüketilebilir. Günde 3,6 mg Astaksantin takviyesi, Iwamoto vd., tarafından bildirildiği gibi sağlığa faydalı olabilmektedir (Iwamoto vd., 2000).

Tablo 1. Mikroorganizmaların Astaksantin içerikleri

Astaksantin Kaynakları	Kuru ağırlıkta Astaksantin (%)
Chlorophyceae	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Bölgesel izolasyon)	3,6

<i>Haematococcus pluvialis</i> (AQSE002)	3,4
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	2,7
Chlorococcum	0,2
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,001
<i>Neochloris wimmeri</i>	0,6
Vivophyceae	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0,02
<i>Ulva lactuca</i>	0,01
Floriideophyceae	
<i>Catenella repens</i>	0,02
Alphaproteobacteria	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0,01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (NITE SD 00017)	2,2
Tremellomycetes	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (JH)	0,5
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (VKPM Y2476)	0,5
Labyrinthulomycetes	
<i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-3 (FERMP-18556)	0,2
Malacostraca	
<i>Pandalus borealis</i>	0,12
<i>Pandalus clarkia</i>	0,015



Doğal ve Yetiştirilmiş Salmonlar

Şekil 2. Doğadaki ve çiftlikteki(*) salmonların Astaksantin seviyeleri (mg/kg et) (EFSA, 2005).

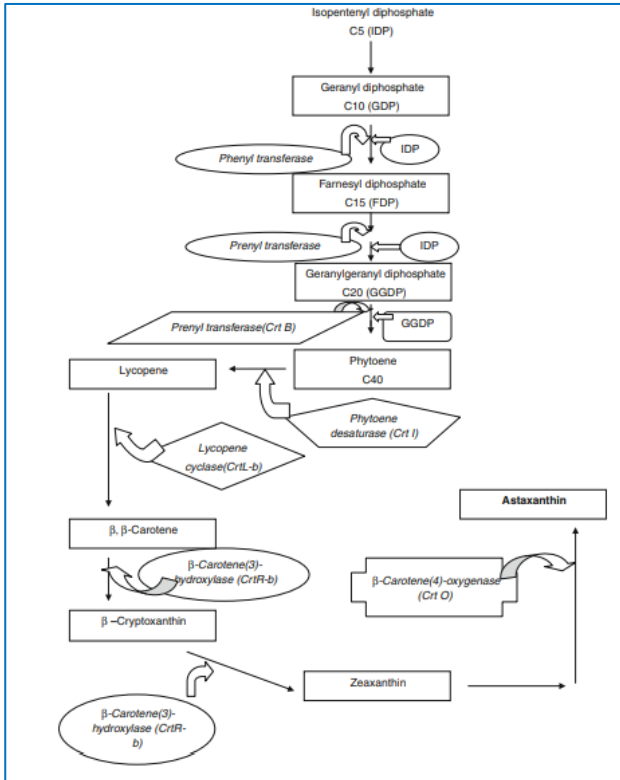
ASTAKSANTİN'İN BİYOSENTEZİ

Astaksantin, su ürünleri yetiştiriciliğinde pigment olarak kullanılan bir ksantofildir. All-trans izomeri doğada az miktarda 9-cis ve 13-cis izomerleri ile birlikte bulunur (Visser vd., 2005). Ekinenon ve kantaksantin yoluyla β-karotenlerin

oluşum şeması, alg, maya ve fotosentetik olmayan bakterilerde iyi karakterize edilir (Fraser vd., 1997; Brittan, 1998). Bakterilerde, alglerde ve mayalarda astaksantin oluşumu için olası biyosentetik yollar Şekil 3'te gösterilmektedir (Bhosale ve Bernstein, 2005).

Mikroorganizmalar kullanılarak karotenoidlerin ticari üretimi, kırmızı maya olan *X. dendrorhous* kullanılarak fermantasyon yoluyla veya *H. pluvialis* algli açık havuzlarda kültürle üretilerek elde edilir (Jacobson vd., 2000; Lorenz ve Cysewski, 2000; Olaizola, 2000).

Transkript seviyeleri ile karotenoid biyosentezi arasında doğrusal bir ilişki bulunmamasına rağmen, β -karoten sentezinin basamaklarında yer alan astaksantin biyosentetik crtE, crtI ve crtYB genleri, *X. dendrorhous*'tan klonlanmıştır (Lodato vd., 2004).



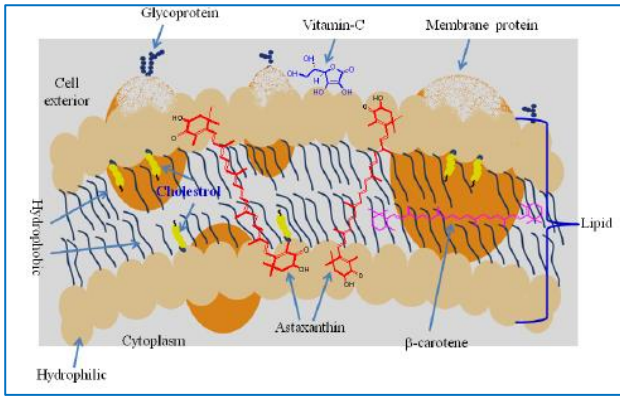
Şekil 3. Potansiyel mikroplar tarafından doğal gıda renklendiricisi olarak astaksantin üretimi (Adapted from Dufosse 2006)

ASTAKSANTİN'İN BİYOSENTEZİ

Astaksantin antioksidan aktivitesi

Bir antioksidan, oksidasyonu engelleyebilen bir moleküldür. Oksidatif hasar, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından başlatılır. Çok yüksek reaktiviteye sahip olan bu moleküller, organizmalarda normal aerobik metabolizma tarafından üretilmektedir. Fazla oksidatif moleküller, zincirleme reaksiyon yoluyla proteinler, lipidler ve DNA ile reaksiyona girerek protein ve lipid oksidasyonuna ve çeşitli bozukluklarla ilişkili DNA hasarına neden olabilmektedir. Bu tip oksidatif moleküller, karotenoidler gibi endojen ve eksojen antioksidanlar tarafından inhibe edilebilmektedir. Karotenoidler, zincir reaksiyonlarını sonlandırmak için singlet oksijeni söndürerek ve radikalleri temizleyerek antioksidan aktiviteler gerçekleştiren polien zinciri, uzun konjuge çift bağlar içermektedir. Karotenoidlerin biyolojik faydaları, hücre membranları ile fiziksel ve kimyasal etkileşimlerine atfedilen antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Naguib vd., (2000) lutein, likopen, α -karoten ve β -karoten gibi çeşitli karotenoidlerle karşılaştırıldığında astaksantin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Naguib 2000). Astaksantin kaynağı olan *Haematococcus* biyokütlesiyle beslenen sıçanların plazma ve karaciğerinde antioksidan enzimlerden katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve tiyobarbütürik asit reaktif maddeleri yüksek olarak bulunmuştur (Ranga Rao vd., 2010). *Haematococcus pluvialis*'ten sağlanan Astaksantin, sıçanlarda serbest radikallere karşı, β -karoten ve luteinin ardından en iyi korumayı sağlamaktadır (Ranga Rao vd., 2010; Ranga Rao vd., 2013). Astaksantin, yüksek antioksidan özelliklerden sorumlu olan her iyonon halkasında hidroksil ve keto parçalarının varlığında benzersiz bir moleküler yapı içermektedir (Hussein vd., 2006; Liu vd., 2007). Astaksantin antioksidan aktivitesi, zeaksantin, lutein, kantaksantin ve β -

karotenden 10 kat daha fazla; α -tokoferolden 100 kat daha yüksek olarak bulunmuştur (Miki 1991). Karotenoidlerdeki okso fonksiyonel grup, pro-oksidatif katkı olmaksızın daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Martin vd., 1999). Astaksantindeki polien zinciri, hücre zarındaki radikalleri yakalarken, astaksantin terminal halkası, hücre zarının dış ve iç kısımlarındaki radikalleri temizleyebilmektedir (Şekil 3). Astaksantin tavşanların diyetine eklendikten sonra serumda antioksidan enzim aktiviteleri değerlendirilmiş, süperoksit dismutaz ve tioredoksin redüktaz aktivitesi artmış, oksidatifle indüklenen tavşanlarda paraoksonaz inhibe edilmiştir (Augusti vd., 2012). Astaksantin, etanol kaynaklı mide ülseri bulunan sıçanlara verildiğinde antioksidan enzim seviyeleri artmıştır (Kamath vd., 2008).



Şekil 4. Astaksantin Hücre Zarı Üzerindeki Konumu (Ranga Rao vd., 2014)

Anti-lipid peroksidasyon aktivitesi

Astaksantin, hücre zarının hem içinde hem de dışında kalmasını sağlayan benzersiz bir moleküler yapıya sahiptir. Lipid çift tabakanın içine yerleştirilebilen β -karoten ve C vitamininden daha iyi koruma sağlamaktadır. Zincirleme reaksiyonları önlemek için radikallerin temizlenmesi; lipid peroksidasyonunu inhibe ederek membran yapısının korunması; bağışıklık sistemi işlevinin geliştirilmesi gibi çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasara karşı bir koruma görevi görmektedir. Astaksantin ve esterleri etanol kaynaklı mide ülseri bulunan sıçanlarda ve cilt kanseri olan sıçanlarda %80 oranında anti lipid

peroksidasyon aktivitesi göstermiştir (Kamath vd., 2008; Ranga Rao vd., 2013). Astaksantin biyolojik örneklerdeki lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Goto vd., 2001; Kamath vd., 2008; Ranga Rao vd., 2009; Ranga Rao vd., 2010; Ranga Rao vd., 2013; Ranga Rao vd., 2013).

Anti-inflamatuar aktivitesi

Astaksantin, biyolojik sistemlerde iltihaplanmayı sona erdirmek için güçlü bir antioksidandır. Haematococcus ve Chlorococcum'un alg hücreleri özleri, *H. pylori* ile enfekte farelerde bakteri yükünü ve mide iltihabını önemli ölçüde azaltmıştır (Bennedson vd., 1999; Liu vd., 2003; Ranga Rao vd., 2010). Park vd., (2010) astaksantin DNA oksidatif hasarını azalttığını böylece genç, sağlıklı, yetişkin dişi insan deneklerde bağışıklık tepkisinin arttığını bildirmişlerdir (Park vd., 2010). Başka bir çalışma, astaksantin esterlerinin ve Haematococcus kaynaklı toplam karotenoidlerin, sıçanlarda etanolün neden olduğu mide ülserlerindeki akut, mide lezyonları üzerinde doza bağlı bir mide koruyucu etki gösterdiğini göstermiştir. Bu, H1, K1 ATPase inhibisyonu, mün içeriğinin regülasyon artışı ve antioksidan aktivitelerindeki artışa bağlanmaktadır (Kamath vd., 2008). Astaksantin, proksimal tübüler epitel hücrelerinde yüksek glukoz kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz üzerinde koruyucu etki göstermiştir. Japon araştırmacılar tarafından bildirildiği üzere Astaksantin, gözlerdeki oküler iltihaplanmanın tedavisi için umut verici bir moleküldür (Ohgami ve ark. 2003; Suzuki vd., 2006). Astaksantin, cildin kalınlaşmasını önleyebilir ve UV kaynaklı cilt hasarına karşı kolajen azalmasını azaltabilmektedir (Santos vd., 2012; Hama vd., 2012; Ranga Rao vd., 2013).

Anti-diyabetik aktivitesi

Diabetes mellitus hastalarında oksidatif stres seviyeleri genellikle çok yüksektir. Hastaların pankreasındaki β hücrelerinin disfonksiyonu ve

doku hasarına bağlı olarak hiperglisemi indüklenmektedir. Astaksantin, pankreas β hücrelerinde hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresi azaltabilmekte ve ayrıca glikoz ve serum insülin seviyelerini iyileştirebilmektedir (Uchiyama vd., 2002). Astaksantin, pankreas β hücrelerini glikoz toksisitesine karşı koruyabilmektedir. Ayrıca, diyabetik sıçanlarla lenfosit işlev bozukluklarının iyileştirilmesinde iyi bir immünolojik ajan olduğu da gösterilmiştir (Otton vd., 2010). Aynı zamanda, lipid/protein oksidasyonunu önleyerek insan umbilikal ven endotel hücrelerinde glikasyon ve glikolize protein kaynaklı sitotoksositeyi inhibe etmektedir (Nishigaki vd., 2010). Astaksantin ile tedavi edilen diyabetik farelerde idrar albümin seviyesi kontrol grubundan önemli ölçüde daha düşük olarak bulunmuştur (Uchiyama vd., 2002). Bazı çalışmalar, astaksantin oksidatif stresi ve böbrek hücresi hasarını azaltarak diyabetik nefropatiyi önlediğini göstermiştir (Naito vd., 2004; Manabe vd., 2008).

Kardiyovasküler aktivitesi

Astaksantin, etkisi hem deney hayvanlarında hem de insan deneklerde incelenmiş anti-inflamatuar etkiye sahip güçlü bir antioksidandır. Oksidatif stres ve inflamasyon, aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojik özellikleridir. Astaksantin, aterosklerotik kardiyovasküler hastalığa karşı potansiyel bir terapötik ajandır (Fassert vd., 2011). Hayvanlarda mikokardiyal iskemi reperfüzyon modeli kullanılarak mikokardiyumun korunmasında disodyum disüksinat astaksantin (DDA) etkinliği değerlendirilmiştir. Miyokard infarkt boyutu Sprague Dawley sıçanlarında azaltılmış ve 25, 50 ve 75 mg/kg vücut ağırlığında DDA ile dört gün ön tedaviden sonra tavşanlarda miyokardiyal iyileşme gözlenmiştir (Gross vd., 2005; Lauver vd., 2005). Astaksantin, yedi gün boyunca 150 ve 500 mg / kg / gün dozunda DDA ile ön işlem yapılan sıçan miyokard dokularında bulunmuştur (Gross vd., 2006). Astaksantin

spontan hipertansif sıçanlarda (SHR), normotansif Wistar Kyoto sıçanlarda (NWKR) ve kendiliğinden hipertansif sıçanlarda (SPSHR) kan basıncı üzerindeki etkileri bildirilmiştir (Monroy-Ruiz vd., 2011). Astaksantin türevi ile beslenen farelerde plazma, kalp, karaciğer, trombositler ve artan bazal arter kan akışında astaksantin bulunmuştur (Khan vd., 2010). Astaksantin ile tedavi edilen insan umbilikal ven endotel hücreleri ve trombositleri, nitrik oksit seviyeleri artmış ve peroksinitrit seviyelerinde azalma göstermiştir (Khan vd., 2010). Yapılan bir çalışmada %0.08 astaksantin ile beslenen fareler, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek kalp mitokondriyal membran potansiyeline ve kasılma indeksine sahip olduğu bulunmuştur (Nakao vd., 2010).

Antikanser aktivitesi

Spesifik antioksidan dozu, çeşitli dejeneratif bozuklukların erken teşhisi için yardımcı olabilmektedir. Normal aerobik metabolizmada süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Singlet oksijen, fotokimyasal olaylarla üretilirken, peroksil radikalleri lipid peroksidasyonu ile üretilmektedir. Bu oksidanlar, DNA, proteinler ve lipidlerin oksidasyonu yoluyla yaşlanma, kanser ve ateroskleroz gibi dejeneratif hastalıklara neden olabilmektedir (Ryu vd., 2012). Antioksidan bileşikler, hücrelerde oksidatif hasarı inhibe ederek mutagenesi ve karsinogenesi azaltır. İnsan tümörlerinde boşluk bağlantıları yoluyla eksik olan hücre-hücre iletişimi ve restorasyonu tümör hücresi çoğalmasını azaltma eğilimindedir. Boşluk bağlantı iletişimi, connexin-43 geninin yukarı regülasyonu yoluyla connexin-43 proteinindeki bir artış nedeniyle oluşmaktadır. Doğal karotenoidler ve retinoidler ile hücreler arasında geçit iletişimi geliştirmiştir (Wolf 1992). Kantaksantin ve astaksantin türevleri, fare embriyosunun fibroblastları arasındaki geçit iletişimini geliştirmektedir (Hanusch vd., 1995; Daubrawa vd., 2005). β -karoten kullanımıyla murin fibroblast hücrelerinde artmış Connexin-

43 ekspresyonu bildirilmektedir (Zhang vd., 1991; Zhang vd., 1992). Astaksantin; kantaksantin ve β -karoten gibi diğer karotenoidlerle karşılaştırıldığında önemli düzeyde antitümör aktivitesi göstermektedir (Chew vd., 1999; Chew vd., 2004). Astaksantin ayrıca fibrosarkom, meme ve prostat kanseri hücrelerinin ve embriyonik fibroblastların büyümesini de inhibe etmiştir (Palozza vd., 2009). Astaksantin, kimyasal olarak indüklenmiş erkek/dişi sıçanlarda ve farelerde hücre ölümünü, hücre çoğalmasını ve meme tümörlerini inhibe etmiştir (Tanaka vd., 1994; Tanaka vd., 1995; Jyonouchi vd., 2000; Prabhu vd., 2009; Nakao vd., 2010). H. pluvialis özütünün, hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğu ve apoptozu teşvik ederek insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği Palozza ve diğerleri tarafından bildirilmiştir (Palozza vd., 2009). Nitro Astaksantin ve 15-nitrik astaksantin, peroksinitritli astaksantin ürünleridir. 15-nitroastaksantin antikanser özellikleri bir fare modelinde değerlendirilmiştir. Epstein-Barr virüsü ve fare derisi papillomlarındaki karsinogenez, astaksantin tedavisi ile önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Maoka vd., 2012).

İmmüno modülasyon

Bağışıklık sistemi hücreleri, serbest radikal hasarına karşı çok hassastır. Hücre zarı, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içermektedir. Antioksidanlar, özellikle astaksantin, bağışıklık sistemi savunmasını korumak için serbest radikal hasarına karşı koruma sağlamaktadır. Astaksantin laboratuvar koşullarında hayvanlarda bağışıklık üzerindeki etkisi hakkında raporlar vardır, ancak insanlarda klinik araştırmalar eksiktir. Astaksantin, β -karotene kıyasla fare modelinde daha yüksek immüno-modüle edici etkiler göstermiştir (Jyonouchi vd., 1991). Astaksantinli diyet takviyesinden sonra yaşlı hayvanlarda gelişmiş antikör üretimi ve azalmış humoral immün yanıt bildirilmiştir (Jyonouchi vd., 1991; Jyonouchi vd., 1994). Astaksantin, bir laboratuvar çalışmasında insan

hücrelerinde immüno globulinlerin üretimini teşvik etmiştir (Jyonouchi vd., 1995). İnsanlarda sekiz haftalık astaksantin takviyesi, kandaki astaksantin seviyelerinin artmasına ve virüslerle enfekte olmuş hücreleri hedef alan ve virüsleri yok eden doğal öldürücü hücrelerin aktivitesinin artmasına neden olmuştur (Park vd., 2010). Bu çalışmada astaksantin takviyeli grupta T ve B hücreleri artmış, DNA hasarı düşük ve C-reaktif protein (CRP) önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (Chew vd., 2004; Park vd., 2011; Augusti vd., 2012).

Astaksantin biyolojik aktiviteleri ile ilgili son raporlar *In vitro* ve *in vivo* modellerde aşağıda sunulmuştur (Ranga Rao vd., 2014).

Astaksantin Biyolojik Aktiviteleri

1. Antioksidan aktivite
2. UV ışınlarından koruma
3. Cilt kanserini önleyici
4. Anti-inflamatuvar
5. Mide hastalıklarına karşı aktivite
6. Kardiyovasküler hastalıkları önleyici
7. Bağışıklık tepkisi
8. Nöroproteksiyon
9. Anti- hepatoprotektif
10. Anti- diyabetik

ASTAKSANTİNİN GÜVENLİĞİ VE DOZU

Astaksantin, gıda ile birlikte tüketildiğinde hiçbir yan etkisi olmaksızın güvenlidir. Sıçanlar astaksantin ile beslendikten sonra hayvan dokularında birikmiş ve toksik etkisi bulunmamıştır (Stewart vd., 2008; Ranga Rao vd., 2010; Ranga Rao vd., 2013). Aşırı astaksantin tüketimi, hayvanların derilerinde sarıdan kırmızıya dönen pigmentasyona yol açmaktadır. Astaksantin, balık yemine dahil edilerek balık derisinin kırmızısı bir renk almasına neden olmaktadır. Astaksantin oral dozajından sonra sıçanlarda süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyeleri gibi antioksidan enzimler önemli ölçüde artmıştır (Ranga Rao vd., 2013; Ranga Rao vd., 2013). Astaksantin supratherapötik

konsantrasyonlarının trombosit, pıhtılaşma ve fibrinolitik fonksiyon üzerinde hiçbir yan etkisi bulunmamaktadır (Serebruany vd., 2010). Araştırmalar şimdiye kadar hayvanlarda ve insanlarda astaksantin tüketiminin önemli bir yan etkisi olmadığını bildirmiştir. Bu sonuçlar, gelecekteki klinik çalışmalar için astaksantin güvenliğini desteklemektedir. Astaksantin chia, keten tohumu, balık, fındık, ceviz ve badem gibi omega-3 açısından zengin yağlı tohumlar ile uygulanması tavsiye edilmektedir.

Astaksantin (4-8 mg) gıdalarda, yumuşak jeller ve kapsüller ve krem şeklinde kombinasyonları piyasada mevcuttur. Önerilen günlük astaksantin dozu 2-4 mg / gün'dür. Bir çalışmada, yetişkin insanlarda astaksantin (6 mg/gün) uygulamasıyla hiçbir yan etkinin bulunmadığı bildirilmiştir (Spiller vd., 2003). Bir çalışmada, kan basıncının (bp) inme eğilimli sıçanlarda ve hipertansif sıçanlarda sırasıyla beş

hafta ve 14 gün boyunca 50 mg/kg astaksantin ile beslenmesiyle azaldığı bildirmiştir (Hussein vd., 2005). Astaksantin ayrıca naproksen kaynaklı gastrit, antral ülserle karşı önemli bir koruma göstermiş ve mide mukozasında lipid peroksidasyon seviyelerini inhibe etmiştir (Kim vd.,2005; Augusti vd., 2012). Astaksantin farelere verildiğinde gözlerde astaksantin birikimi gözlemlenmiştir (Petri vd., 2007). Astaksantin biyoyararlanımı, lipit bazlı formülasyonların takviyesi ile artmıştır (Odeberg vd., 2003; Ranga Rao vd., 2010; Ranga Rao vd., 2013; Ranga Rao vd., 2013). Astaksantin insan kan akışı üzerindeki etkileri, 10 gün boyunca 6 mg/gün astaksantin uygulamasından sonra single-blind yöntemiyle yetişkin erkeklerde araştırılmıştır (Miyawaki vd., 2008). İnsan sağlığına yararları üzerindeki astaksantin doza etkilerine ilişkin son çalışmalar Tablo 2'te sunulmuştur.

Tablo 2. İnsan deneklerinde astaksantin sağlık yararları (Ranga Rao vd., 2014).

Deney Süresi	İnsanlarda Konular	Doz (mg / gün)	Astaksantin Faydaları
2 hafta	Gönüllüler	1.8, 3.6, 14.4 ve 21.6	LDL oksidasyonunun azaltılması
Tek doz	Orta yaşlı erkek gönüllüler	100	Astaksantin, VLDL kilomikronlar tarafından ele alınır
8 hafta	Sağlıklı dişiler	0.2 ve 8	Azalmış plazma 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin ve CRP seviyelerinde düşürülmüştür
8 hafta	Sağlıklı yetişkinler	6	Kan basıncı ile değerlendirildi
10 gün	Sağlıklı erkekler	6	Geliştirilmiş kan reolojisi
12 hafta	Sağlıklı, sigara içmeyen Finli erkekler	8	Yağ asitlerinin oksidasyonunda azalma
12 ay	Yaşa bağlı makula dejenerasyonu	4	Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda gelişmiş merkezi retina disfonksiyonu
12 hafta	Orta yaşlı / yaşlı	12	Geliştirilmiş Cog sağlığı pil puanları
12 hafta	Orta yaşlı / yaşlı	6	Groton labirent öğrenme testi puanları iyileştirildi
8 veya 6 hafta	Sağlıklı kadın veya erkek	6	Geliştirilmiş cilt kırıklığı, korneosit tabakası, epidermis ve dermis
2 hafta	Hastalık (iki taraflı katarakt)	6	İnsan gözyaşı salgısında gelişmiş süperoksit temizleme aktivitesi sağlar ve hidroperoksitleri düşürür.

LDL, Düşük yoğunluklu lipoproteinler, VLDL, Çok düşük yoğunluklu lipoprotein, CRP, C-reaktif protein.

ASTAKSANTİNİN GÜVENLİĞİ VE DOZU

Doğal kaynaklardan astaksantin üretimi, biyoteknolojideki en başarılı faaliyetlerden biri haline gelmiştir. Astaksantin gıda, yem,

nutrasötik ve farmasötik uygulamalarında büyük talep görmektedir. Bu durum, sentetik kaynaklar yerine biyolojik kaynaklardan astaksantin üretimini geliştirmeye yönelik büyük çabaları

Treatment of premature calves

teşvik etmektedir. Güncel literatüre göre, astaksantin piyasadaki çeşitli ticari uygulamalarda kullanılmaktadır. Astaksantin ürünleri piyasada kapsül, yumuşak jel, tablet, toz, biyokütle, krem, enerji içeceği, yağ ve öz şeklinde mevcuttur (Tablo 3). Astaksantin ürünlerinin bir kısmı diğer karotenoidler, multivitaminler, bitkisel özler ve omega-3,6 yağ

asitleri ile kombinasyon yapılmıştır. Bakteriyel enfeksiyon, iltihaplanma, damar hastalıkları, kanser, kardiyovasküler hastalıkları önlemek, lipid peroksidasyonunu engellemek, hücre hasarını ve vücut yağını azaltmak ve beyin fonksiyonunu ve cilt hastalıklarını iyileştirmek için astaksantin üzerine patent başvuruları mevcuttur (Tablo 4).

Tablo 3. Çeşitli Ticari firmaların Astaksantin ürünleri ve çeşitli amaçlarla kullanımı.

Marka adı	Dozaj formu	Malzemeler	Şirket Adı	Amaç
Physician Formulas	Yumuşak jel / Tabletler	2 mg / 4 mg-AX	Hekim formülleri vitamin şirketi	Antioksidan
Eyesight Rx	Tablet	AX, C vitamini, bitki özleri	Hekim formülleri Vitamin şirketi	Görme işlevi
KriaXanthin	Yumuşak jel	1,5 mg-AX, EPA, DHA	Hekim formülleri vitamin şirketi	Antioksidan
Astaksantin Ultra	Yumuşak jel	4 mg-AX	AOR	Kardiyovasküler sağlık / gastrointestinal
Astaxanthin Gold™	Yumuşak jel	4 mg-AX	Nutrigold	Göz / eklem / cilt / bağışıklık sağlığı
Best Astaxanthin	Yumuşak jel	6 mg-AX, CX	Bioastin	Hücre zarı / kan akışı
Dr Mercola	Kapsüller	4 mg AX, 325 mg Omega-3 ALA	Dr.Mercola premium takviyeleri	Yaşlanma / kas
Solgar	Yumuşak jel	5 mg-AX	Solgar global üretimi	Sağlıklı cilt
Astaksantin	Krem	AX, bitkisel özler	True botanica	Yüz nemlendirme
astavita ex	Kapsüller	8 mg AX, T3	Fuji Kimya Endüstrisi	Yaşlanma karşıtı bakım
astavita SPOR	Kapsüller	9 mg AX, T3 ve çinko	Fuji Kimya Endüstrisi	Spor Beslenmesi
AstaTROL	Yağ	AX	Fuji Kimya Endüstrisi	Makyaj malzemeleri
AstaFX	Kapsüller	AX	Saflık ve ürün kanıtı dayalı besin takviyeleri	Deri / kardiyovasküler fonksiyon
Pure Encapsulations	Kapsüller	AX	Sinerjik beslenme	Antioksidan
Zanthin Xp-3	Yumuşak jel kapsüller	2 mg, 4 mg-AX	Valensa	İnsan vücudu
Micro Algae Super Food	Yumuşak jel	4 mg AX	Anumed intel biomed şirketi	Kalp / göz / eklem

AX, astaksantin, AX, astaksantin esterleri, CX, kantaksantin, DHA, dokosaheksaenoik asit, EPA, eikosapentaenoik asit, ALA, alfa linolenik asit, T3, tokotrienol.

SONUÇ

Astaksantin ile ilgili in vitro ve in vivo modellerde mevcut araştırma verileri cesaret vericidir. Astaksantin, kanserler, hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler, gastrointestinal,

karaciğer, nörodejeneratif ve cilt hastalıkları gibi çeşitli hastalıklar üzerinde potansiyel etkiler göstermiştir. Antioksidan özelliği, hastalıklı hücrelerde oksidatif hasara karşı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, astaksantin

esterleri (mono-di) ve biyolojik sistemlerdeki metabolik yolları hakkında araştırma eksikliği vardır. Gelecekteki araştırmalar, astaksantin esterlerinin çeşitli biyolojik aktiviteler üzerindeki etkilerine ve bunların nutrasötik ve farmasötik uygulamalardaki kullanımlarına odaklanmalıdır. Astaksantin mono-diesterler,

biyolojik aktiviteleri metabolizma tarafından kolayca emilebilen serbest formdan daha iyi artırabilir. Daha fazla araştırma, metabolik yollarının araştırılmasını ve ayrıca ticari amaçlarla kullanımları için in vitro ve in vivo modellerde moleküler çalışmaların araştırılmasını gerektirmektedir.

Tablo 4. Astaksantin için son patent başvuruları (Ranga Rao vd., 2014).

Patent No	Başlık	Amaç
US2006021744	Doğal astaksantin özü, DNA oksidasyonunu azaltır	Endojen oksidatif hasarı azaltır.
US20070293568	Nörosit koruyucu ajan	Nöroproteksiyon
US20080234521	Astaksantin kristal formları	Besin dozu
US20080293679	COX inhibitörlerinin belirli olumsuz etkilerinin azaltılması / inhibisyonu için karotenoidlerin ve karotenoid türevleri analoglarının kullanımı	Lipid peroksidasyonunu inhibe eder.
US20090047304	Vücut yağı azaltma bileşimi	Vücut yağlanmasını engeller.
US20090069417	Kemopreventif ve kemoterapötik ajanlar olarak karotenoid oksidasyon ürünleri	Kanseri önleme
US20090136469	Kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkileri olan oral uygulama için formülasyon	Kardiyovasküler koruma
US20090142431	Alg ve yosun özü diyet takviyesi bileşimi	Diyet takviyesi
US20090297492	Bilişsel performansı iyileştirme yöntemi	Beyin işlevini iyileştirmek
US20100204523	Karotenoid pigmentin ve bunun için kullanılan kabın renginin solmasını önleme yöntemi	Renk değişiminin önlenmesi
US20100267838	İçeceklerin renklendirilmesi için toz halinde karotenoid hazırlama	İçecekler
US20100291053	İnflamatuar hastalıkların tedavisi	İnflamatuar hastalığı önleme
US20120004297	Vasküler yetmezliği hafifletmek için ajan	Vasküler yetmezliğin önlenmesi
US20120114823	Geliştirilmiş pigment tutma için yem katkı maddesi	Balık yemi
US20120238522	Karotenoid içeren bileşimler ve yöntemler	Bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi
US20120253078	Domuz yetiştiriciliğinde karkas performansını iyileştirmek için ajan	Besin takviyeleri
US20130004582	Eklem ağrısını hafifletmek için bileşim ve yöntem	Azaltılmış eklem ağrısı ve osteoartrit semptomları
US20130108764	Astaksantin içeren hamurdan üretilen pişmiş yiyecekler	Pişmiş yiyeceklerde kullanılan astaksantin

AÇIKLAMALAR

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

KAYNAKLAR

- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014).** Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Marine drugs*, 12(1), 128-152.
- Augusti, P. R., Quatrin, A., Somacal, S., Conterato, G. M., Sobieski, R., Ruviaro, A. R., ... & Emanuelli, T. (2012).** Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, Volume 51 Issue 1 Pages 42-49.
- Bhosale P, Bernstein PS (2005)** Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 445–455.
- Britton, G. (1998)** Overview of carotenoid biosynthesis. *Carotenoids*, 3, 13-147.
- Catanzaro, E., Bishayee, A., & Fimognari, C. (2020).** On a beam of light: Photoprotective activities of the marine carotenoids astaxanthin and fucoxanthin in suppression of inflammation and cancer. *Marine Drugs*, 18(11), 544.
- Chew, B. P., Park, J. S., Wong, M. W., & Wong, T. S. (1999).** A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer research*, 19(3A), 1849-1853.
- Chew, B. P., & Park, J. S. (2004).** Carotenoid action on the immune response. *The Journal of nutrition*, 134(1), 257S-261S.
- Choi, S., & Koo, S. (2005).** Efficient syntheses of the keto-carotenoids canthaxanthin, astaxanthin, and astacene. *The Journal of Organic Chemistry*, 70(8), 3328-3331.
- Daubrawa, F., Sies, H., & Stahl, W. (2005).** Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts. *The Journal of nutrition*, 135(11), 2507-2511.
- D’Orazio, N.; Gammone, M.A.; Gemello, E.; DeGirolamo, M.; Cusenza, S.; Riccioni, G. (2012).** Marine bioactives: Pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. *Mar. Drugs*, 10, 812–833.
- Dufossé, L. (2006).** Microbial production of food grade pigments. *Food technology and Biotechnology*, 44(3), 313-323.
- EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) (2005).** Hayvanların beslenmesinde renklendirici ajanların güvenliğine ilişkin Avrupa komisyonunun talebi üzerine, hayvan yemlerinde kullanılan katkı maddeleri ve ürünler veya maddeler hakkındaki bilimsel panel görüşü. *EFSA J.*, 291, 1–40.
- Fassett, R. G., & Coombes, J. S. (2011).** Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine drugs*, 9(3), 447-465.
- Fraser, P. D., Miura, Y., & Misawa, N. (1997).** In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6128-6135.
- Gammone, M. A., Riccioni, G., & D’Orazio, N. (2015).** Marine carotenoids against oxidative stress: effects on human health. *Marine Drugs*, 13(10), 6226-6246.
- Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E., & Terada, H. (2001).** Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 1512(2), 251-258.
- Hama, S., Takahashi, K., Inai, Y., Shiota, K., Sakamoto, R., Yamada, Tsuchiya, H., Kanamura, K., Yamashita, E., Kogure, K. (2012).** Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(8), 2909-2916.
- Hanusch, M., Stahl, W., Schulz, W. A., & Sies, H. (1995).** Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317(2), 423-428.
- Hussein, G., Nakamura, M., Zhao, Q., Iguchi, T., Goto, H., Sankawa, U., & Watanabe, H. (2005).** Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(1), 47-52.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006).** Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products*, 69(3), 443-449.
- Iizuka, M., Ayaori, M., Uto-Kondo, H., Yakushiji, E., Takiguchi, S., Nakaya, K., ... & Ikewaki, K. (2012).** Astaxanthin enhances ATP-binding cassette transporter A1/G1 expressions and cholesterol efflux from macrophages. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 58(2), 96-104.
- Jacobson GK, Jolly SO, Sedmark JJ, Skatrud TJ, Wasileski JM (2000)** Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma*. Method for their cultivation and their use in animal feeds. US Patent 6,015,684
- Jyonouchi, H., Hill, R. J., Tomita, Y., & Good, R. A. (1991).** Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of β -carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system. *Nutrition and Cancer*, 16: 93–105.
- Jyonouchi, H., Zhang, L., Gross, M., & Tomita, Y. (1994).** Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigens. *Nutr Cancer*. 21(1):47–58.
- Jyonouchi, H., Sun, S., & Gross, M. (1995).** Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to at-dependent stimulant and antigen. *Nutr Cancer*. 23(2):171–183.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., & Gross, M. D. (2000).** Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and cancer*, 36(1), 59-65.

- Katagiri, M., Satoh, A., Tsuji, S., & Shirasawa, T. (2011).** Effects of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract on cognitive function: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 1203270150-1203270150.
- Khan, S. K., Malinski, T., Mason, R. P., Kubant, R., Jacob, R. F., Fujioka, K., ... & Bodary, P. F. (2010).** Novel astaxanthin prodrug (CDX-085) attenuates thrombosis in a mouse model. *Thrombosis research*, 126(4), 299-305.
- Kim, J. H., Kim, Y. S., Song, G. G., Park, J. J., & Chang, H. I. (2005).** Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. *European journal of pharmacology*, 514(1), 53-59.
- Krinsky, N. I. (1994).** The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66(5), 1003-1010.
- Lauver, D. A., Lockwood, S. F., & Lucchesi, B. R. (2005).** Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/ reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2), 686-692.
- Liu, B. H., & Lee, Y. K. (2003).** Effect of total secondary carotenoids extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice. *Int. immunopharmacology*, 3(7), 979-986.
- Liu, X., & Osawa, T. (2007).** Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(1), 187-193.
- Lockwood, S. F., & Mason, R. P. (2008).** *U.S. Patent Application No. 11/417,307.*
- Lodato P, Alcaino J, Barahona S, Retamales P, Jimenez A, Cifuentes V (2004)** Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol Res*, 37, 83-93
- Lorenz, R. T. (1999).** A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose™ Technical Bulletin*, 60, 1-12.
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000).** Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, 18(4), 160-167.
- Manabe, E., Handa, O., Naito, Y., Mizushima, K., Akagiri, S., Adachi, S., ... & Yoshikawa, T. (2008).** Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. *Journal of cellular biochemistry*, 103(6), 1925-1937.
- Maoka, T., Tokuda, H., Suzuki, N., Kato, H., & Etoh, H. (2012).** Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxyxynitrite. *Marine drugs*, 10(6), 1391-1399.
- Martin, H. D., Jäger, C., Ruck, C., Schmidt, M., Walsh, R., & Paust, J. (1999).** Anti-and prooxidant properties of carotenoids. *Journal für praktische Chemie*, 341(3), 302-308.
- Miki, W. (1991).** Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem*, 63(1), 141-146.
- Monroy-Ruiz, J., Sevilla, M. Á., Carrón, R., & Montero, M. J. (2011).** Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*, 63(1), 44-50.
- Naguib, Y. M. (2000).** Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1150-1154.
- Naito, Y., Uchiyama, K., Aoi, W., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshida, N., ... & Yoshikawa, T. (2004).** Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors*, 20(1), 49-59.
- Nakao, R., Nelson, O. L., Park, J. S., Mathison, B. D., Thompson, P. A., & Chew, B. P. (2010).** Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice. *Anticancer research*, 30(6), 2171-2175.
- Nakao, R., Nelson, O. L., Park, J. S., Mathison, B. D., Thompson, P. A., & Chew, B. P. (2010).** Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer Research*, 30(7), 2721-2725.
- Nishigaki, I., Rajendran, P., Venugopal, R., Ekambaram, G., Sakthisekaran, D., & Nishigaki, Y. (2010).** Cytoprotective role of astaxanthin against glycated protein/iron chelate-induced toxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(1), 54-59.
- Odeberg, J. M., Lignell, Å., Pettersson, A., & Höglund, P. (2003).** Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *European journal of pharmaceutical sciences*, 19(4), 299-304.
- Ohgami, K., Shiratori, K., Kotake, S., Nishida, T., Mizuki, N., Yazawa, K., & Ohno, S. (2003).** Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(6), 2694-2701.
- Olaizola, M. (2000).** Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 499-506.
- Otton, R., Marin, D. P., Bolin, A. P., dos Santos, R. D. C. M., Polotow, T. G., Sampaio, S. C., & de Barros, M. P. (2010).** Astaxanthin ameliorates the redox imbalance in lymphocytes of experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 186(3), 306-315.
- Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M. C., & Picci, N. (2009).** Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer letters*, 283(1), 108-117.
- Petri, D., & Lundebye, A. K. (2007).** Tissue distribution of astaxanthin in rats following exposure to graded levels in the feed. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2), 202-209.

- Prabhu, P. N., Ashokkumar, P., & Sudhandiran, G. (2009).** Antioxidative and antiproliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1, 2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. *Fundamental & clinical pharmacology*, 23(2), 225-234.
- Ranga, R., Sarada, A. R., Baskaran, V., & Ravishankar, G. A. (2009).** Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(11), 1333-1341.
- Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R. L., Baskaran, V., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2010).** Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8553-8559.
- Ryu, S. K., King, T. J., Fujioka, K., Pattison, J., Pashkow, F. J., & Tsimikas, S. (2012).** Effect of an oral astaxanthin prodrug (CDX-085) on lipoprotein levels and progression of atherosclerosis in LDLR^{-/-} and ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*, 222(1), 99-105.
- Santos, S. D., Cahú, T. B., Firmino, G. O., de Castro, C. C., Carvalho Jr, L. B., Bezerra, R. S., & Filho, J. L. L. (2012).** Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. *Journal of Food Science*, 77(7), H141-H146.
- Serebruany, V., Malinin, A., Goodin, T., & Pashkow, F. (2010).** The in vitro effects of Xancor, a synthetic astaxanthine derivative, on hemostatic biomarkers in aspirin-naive and aspirin-treated subjects with multiple risk factors for vascular disease. *American j. of therapeutics*, 17(2), 125-132.
- Stewart, J. S., Lignell, Å., Pettersson, A., Elfving, E., & Soni, M. G. (2008).** Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(9), 3030-3036.
- Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Jin, X. H., Ilieva, I., Koyama, Y., ... & Ohno, S. (2006).** Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-κB signaling pathway. *Experimental eye research*, 82(2), 275-281.
- Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A., & Mori, H. (1994).** Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, 15(1), 15-19.
- Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., & Hara, A. (1995).** Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Research*, 55(18), 4059-4064.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., & Yoshikawa, T. (2002).** Astaxanthin protects β-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, 7(5), 290-293.
- Visser, H., van Ooyen, A. J., & Verdoes, J. C. (2003).** Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS yeast research*, 4(3), 221-231.
- Wolf, G. (1992).** Retinoids and carotenoids as inhibitors of carcinogenesis and inducers of cell-cell communication. *Nutrition reviews*, 50(9), 270-274.
- Zhang, L. X., Cooney, R. V., & Bertram, J. S. (1991).** Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12(11), 2109-2114.
- Zhang, L. X., Cooney, R. V., & Bertram, J. S. (1992).** Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer research*, 52(20), 5707-5712.

Prematüre buzağuların bakım ve tedavisine güncel yaklaşımlar

Current approaches to the care and treatment of premature calves

ÖZET

Buzağı ölümleri, Dünyada ve ülkemizde sığır yetiştiriciliğinin en önemli problemidir. Buzağı kayıpları, en yoğun perinatal ve neonatal dönemde yaşanır. Prematüre doğum, Dünyada ve Türkiye'de buzağı ölümlerinin önemli ve yaygın bir nedeni olmaya devam ediyor. Prematüre buzağular, hastalıklara karşı oldukça duyarlı olduklarından özel bakıma ve tedaviye ihtiyaç duyarlar. Prematüre buzağı kayıplarının en önemli nedeni akciğer gelişim yetersizliğidir. Prematüre doğan buzağularda akciğer gelişim yetersizliği sonucunda meydana gelen sürfaktan eksikliğinde akciğer yüzey gerilimi azaltılmaz, akciğerlerin hava ile dolumu yeterince sağlanamaz ve buna bağlı respiratorik distress sendrom (RDS) gelişir. Prematüre buzağularda ölümün en önemli sebebi RDS'dir. Prematüre buzağuların tedavi ve bakımın zor olması ve prognozunun kötü olduğu anlayışından dolayı, prematüre buzağular adeta ölüme terk edilmektedir. Oysa prematüre buzağuların doğru tedavi ve iyi bakımla hayatta kalma oranlarının oldukça yüksek olabileceği unutulmamalıdır. Bu derlemede, prematüre buzağuların doğru tedavisi ve iyi bakımı ile ilgili güncel ve deneyimsel bilgilerimiz bilim insanı ve klinisyenlerle paylaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prematüre buzağı, RDS, tedavi, bakım

ABSTRACT

Calf death is the most important problem of cattle breeding in the world and in our country. Calf losses are most intense in the perinatal and neonatal period. Premature birth remains an important and common cause of calf mortality in the world and Turkey. The most important cause of premature calf losses is lung development failure. In the case of surfactant deficiency that occurs as a result of lung development failure in premature calves, lung surface tension is not reduced, air filling in the lung cannot be achieved sufficiently, and thus respiratory distress syndrome (RDS) develops. RDS is the most important cause of death in premature calves. Premature calves are almost left to die due to reasons such as the fact that treatment and care of premature calves are difficult and the prognosis is poor. Due to the understanding that treatment and care of premature calves are difficult and their prognosis is poor, premature calves are almost left to die. However, it should be kept in mind that the survival rate of premature calves with correct treatment and good care can be quite high. In this review, our current and experiential knowledge about the correct treatment and good care of premature calves was shared with scientists and clinicians.

Keywords: Premature calf, RDS, treatment, care

How to cite this article

Ok, M., Ider, M., Kapar, MM., Yıldız, İK. (2021). Prematüre buzağuların bakım ve tedavisine güncel yaklaşımlar. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 331-342. <https://doi.org/10.31797/vetbio.959012>

Review Article

Mahmut Ok^{1a}
Merve İder^{1b}
Muhammed Mustafa Kapar^{1c}
İbrahim Kubilay Yıldız^{1d}

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

ORCID-

^a[0000-0002-8210-6735](https://orcid.org/0000-0002-8210-6735)

^b[0000-0003-2928-5452](https://orcid.org/0000-0003-2928-5452)

^c[0000-0002-8127-6994](https://orcid.org/0000-0002-8127-6994)

^d[0000-0001-9052-6046](https://orcid.org/0000-0001-9052-6046)

Correspondence

Mahmut OK

mok@selcuk.edu.tr

Article info

Submission: 29-06-2021

Accepted: 23-11-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

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



GİRİŞ

Buzağı ölümleri, Dünyada ve ülkemizde sığır yetiştiriciliğinin en önemli problemlerindendir.

Buzağı kayıpları, en yoğun perinatal ve neonatal dönemde yaşanır. Perinatal dönem; doğum öncesinde, esnasında veya doğumu takiben 48 saat içerisinde kapsarken, neonatal dönem ise doğumdan sonraki ilk 28 günü kapsar (Çelik vd., 2016; Gundelach vd., 2009; Ok vd., 2009). Neonatal dönemdeki buzağı kayıplarının birincil sebebi ishale seyreden hastalıklar, ikincil nedeni ise solunum yolu hastalığı oluştururken (Coskun vd., 2010; Ok vd., 2009; Ok vd., 2020; Sen vd., 2009), perinatal dönemdeki buzağı kayıplarının birincil sebebi gelişimini tamamlamadan doğan prematüre buzağı, ikincil sebeplerini de yeni doğan buzağıya yeterince özenin gösterilmemesi, güç doğum, travma ve konjenital anomaliler oluşturur (Gundelach vd., 2009; Johanson ve Berger, 2003; Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017). Perinatal buzağı kaybı ABD’lerinde % 8-9 (Meyer vd., 2001), Avrupa ülkelerinde % 10 (Johanson ve Berger, 2003) ve ülkemizde kesin veri olmamakla birlikte % 12.7 (Çelik vd., 2016) civarında olduğu tahmin edilmektedir.

Prematüre ifadesi terminolojide erken ya da günsüz doğan anlamında kullanılır. Gebeliğin 260. gününden önce canlı doğan buzağılar prematüre olarak tanımlanır. İneklerde normal gebelik süresi tamamlanmadan gebeliğin 230-260 günleri arasında gerçekleşen doğumlar “prematüre doğum”, bu tür doğumlarda canlı olarak doğan buzağılar ise “prematüre buzağı” olarak tanımlanır (Altuğ vd., 2013; Aydoğdu vd., 2016; Güzelbekteş vd., 2012; Irmak ve Turgut, 2011; Kornmatitsuk vd., 2003; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017).

Bu derlemenin yazılmasında temel amaç; son yıllarda prematüre doğan buzağılarda bakım ve tedavisine güncel yaklaşımlar hakkında bilgileri bilim insanları ve klinisyenlerle paylaşmaktır.

ETİYOLOJİ

Prematüre buzağı doğumlarının etiyojisi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen birçok faktör ve değişik patolojik mekanizmalar etkili olabileceği ifade edilmektedir. Prematüre veya abort doğumlara başta enfeksiyöz hastalıklar (bakteriyel, viral, fungal ve protozoal) olmak üzere, fiziksel faktörler (hipotermi, hipertermi, hipoksi, travma), metabolik hastalıklar (tiroid bozuklukları), çevresel faktörler (toksik bitki tüketimi, bazı ilaç uygulamaları, mikotoksinler ve beslenme yetersizliği), hormonal faktörler (kortikosteroid, östrojen ve prostaglandin uygulamaları), canlı aşılardan ve genetik faktörler (otozomal genler) yoluyla açabileceği bildirilmektedir (Fluegel-Dougherty vd., 2013; Palmer vd., 1996; Radostits vd., 2007; Warner, 2009). Prematüre doğumların oluşum mekanizmasında plasentomların normal şekilde olgunlaşmamasından dolayı maternal karunkulaların fetal villuslardan ayrılması, enfeksiyöz nedenlere bağlı yangısal değişikliklerin plasentomlardaki maternal ve fetal dokuları birlikte etkilemesi, plasentomların dejenerasyonu ve villus nekrozu gibi faktörlerin etkili olabileceği rapor edilmiştir (Sheldon vd., 2004; Yıldız vd., 2017). Akut rumen asidozunda oluşan endotoksin ve metabolitlerin dolaşıma katılması (Altuğ vd., 2013; Radostits vd., 2007), şiddetli karaciğer yağlanması (Macfarlane ve Walker, 2007), protein, enerji, vitamin ve mineral madde yetersizliklerinin prematüre buzağı doğumlarına yol açabileceği ortaya konmuştur (Radostits vd., 2007). Gül ve Baykalır (2013) prematüre buzağılarda β-karoten düzeyinin önemli oranda düşük olduğunu, β-karoten eksikliğinin prematüre doğuma yol açabileceğini bildirmişlerdir. Gebelik döneminde anneye uygulanan glikokortikoid ve prostaglandin F_{2α} analogları, gebeliğin son döneminde sedasyonla yapılan tırnak kesimi ve nakillerin prematüre doğuma zemin hazırlayabileceği rapor edilmiştir (Bleul, 2009).

PATOGENEZ

Prematüre buzağular normal gelişim sürecini tamamlamadan doğdukları için solunum sistemi, gastrointestinal sistem, dolaşım sistemi, sinir sistemi ve metabolizmayla ilgili pek çok probleme sahip olabilirler (Aydoğdu vd., 2016; Bleul, 2009; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019). Prematüre doğan buzağularda en önemli problem yetersiz akciğer gelişimidir. Bu durumda akciğerler, yeterince sürfaktan sentezleyemez. Akciğerde tip-II pnömositler tarafından salgılanan ve yapısı itibarıyla %90'ını lipidlerin oluşturduğu sürfaktan, akciğer yüzey gerilimini azaltan, akciğerlerin genişmesini sağlayarak gaz alış-verişini kolaylaştıran ve ödem oluşumunu engelleyen kompleks bir maddedir. Diğer bir deyişle sürfaktan, akciğer alveollerinin ve bronşiollerin iç yüzünü örten sıvı film tabakası içinde bulunan ve bu sıvının yüzey gerilimini azaltan, tip-II pnömositlerin salgıladığı yüzey aktif maddelerine verilen genel isimdir. Özellikle fetal gelişime paralel olarak sürfaktan bileşimi değişiklik gösterir ve akciğeri doğum sonrası solunuma hazırlar (Ortatatlı ve Çiftci, 1996). Prematüre doğan buzağularda akciğer gelişim yetersizliği sonucunda meydana gelen sürfaktan eksikliğinde akciğer yüzey gerilimi azaltılmaz, akciğerlerin hava ile dolumu yeterince sağlanamaz ve buna bağlı doğumdan sonra başlayan solunum güçlüğü, hırıltılı solunum ve inlemelerle karakterize olan respiratorik distres sendrom (RDS) gelişir. Premature buzağularda ölümlerin en önemli sebebi respiratorik distres sendrom gelişimidir (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız ve Ok, 2017; Yıldız vd., 2019). Yeni doğan yavruarda sürfaktan yetersizliğinde pulmoner uyum bozukluğu sonucu hava değişiminde aksamalara ilişkin hipoksi, intersitisyel yangı, aşırı zorlanmaya bağlı pulmoner hipertansiyon ve intersitisyel ödem oluşur, tedavi edilmediği takdirde genellikle kısa süre içinde ölüm meydana gelir (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız ve Ok, 2017). Prematüre doğanlarda diğer

bir problemde gastrointestinal sistem ile ilgili bozukluklardır. İntestinal motiliteyi konu alan çalışmalar, prematüre bebeklerin zamanında doğanlara göre bağırsak hipomotilitesine sahip olduğunu ve oral beslenmenin hipomotilitenin şiddetini arttırdığını göstermiştir. Güzelbekteş vd., (2012) prematüre buzağuların çoğunda gastroösefagiyal reflü geliştiğini ve mutlaka buna yönelik tedavi gerekliliğini vurgulamışlardır. Gelişimini tam olarak sağlayamayan preterm bebeklerde besinlerin yetersiz sindirimi ve geçiş zamanının uzaması yetersiz bağırsak bariyer savunması ile birlikte bağırsak hasarına neden olabileceği ifade edilmektedir. Yıldız vd., (2019) yaptıkları çalışmada RDS'li prematüre buzağularda fazla miktarda kolostrum verilmesinin RDS'yi şiddetlendirerek ölüm riskini artırmanın yanında, bağırsaklara bası yaparak mikrosirkülasyonunu olumsuz etkileyerek bağırsak hasarı oluşturduğunu bağırsak hasar biyobelirteçleri ile tespit etmişler ve prematüre buzağularda mümkünse kolostrumu az miktarda ve sık aralıklarla verilmesinin gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yine aynı araştırmacılar atresia kolili buzağularda bağırsaklarda uzun süre biriken içeriğinin mikrosirkülasyon ve oksijenizasyonu bozarak hasarın neden olduğunu bağırsak hasar biyobelirteçleri ile ortaya koymuşlardır (Yıldız vd., 2018).

KLİNİK BULGULAR

Prematüre buzağularda yaygın olarak görülen fiziksel bulgular; düşük canlı ağırlık, kısa yumuşak tüylülük (Figür 1), dişlerin diş etlerinden tam olarak sıyrılmaması (Figür 2), ayak tırnaklarının yumuşaklığı (Figür 3), halsizlik, emme refleksinin yetersiz olması ve solunum güçlüğüdür (Güzelbekteş vd., 2012; Koterba ve Madigan, 1990; Ok vd., 2000; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017). Bu bulgular içinde dikkat çeken en önemli klinik semptom kötüye giden ilerleyici bir solunum güçlüğü tablosudur. Prematüre buzağularda solunum güçlüğüne ilişkin olarak abdominal

solunum, hırıltılı solunum, inleme, burun kanatlarının açılması ve göz mukozasının kirli mavi renk (siyanoz) alması gibi semptomlar belirlenir. Tüm bu klinik bulgular prematürelere respiratorik distres sendroma işaret eder (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017). Bunun yanında kolostrum tüketen buzağlarda abdominal gerginlik oluşumu söz konusu olursa bağırsak hareketlerin yeterince sağlanmadığı anlamına gelir.



Figür 1. Kısa ve yumuşak tüylülük (Ok 2020).



Figür 2. Diş etlerinden sıyrılmamış dişler (Ok 2020).

Respiratorik distres sendrom kriterleri;

- Respiratorik asidozis,
- Hipoksi ($PaO_2 < 60$ mmHg),
- Hiperkapnia ($PaCO_2 > 45$ mmHg),

- Takipne (Solunum sayısı > 45 /dk),
- Abdominal inlemeli ve/veya hırıltılı solunumdur (Bluel vd., 2008; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017).



Figür 3. Yumuşak tırnaklar (Ok 2020).

TEŞHİS

Prematüre buzağların teşhisi anamnez, klinik ve laboratuvar (kan gazı) bulgulara göre konur. Gebelik süresinin kısalığı, düşük canlı ağırlık, kısa yumuşak tüylülük, diş etlerinin dişlerden tam olarak sıyrılmaması, ayak tırnaklarının yumuşaklığı gibi klinik belirtiler RDS'siz prematüre buzağı olduğunu gösterirken (Koberte vd., 1990; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019), RDS'li prematüre buzağlarda ise yukarıda sözü edilen klinik bulgulara ilave olarak takipne (solunum sayısı > 45 /dk), abdominal solunum, ekspiratuvar inleme, inspirasyon sırasında sternum, interkostal kaslar ve alt kostaların içeri doğru çekilmeleri, burun kanatlarının solunuma katılması gibi fiziksel bulgular ve respiratorik asidoz, hipoksi ($PaO_2 < 60$ mmHg), hiperkapnia ($PaCO_2 > 45$ mmHg), hiperlaktatemi gibi laboratuvar bulgular gözlemlenir (Bluel vd., 2008; Ok vd., 2020; Ok, 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019).

TEDAVİ VE BAKIM

Prematüre buzağlar, en fazla bakıma ve özene ihtiyaç duyan yavrulardır. Doğduklarında başta akciğer olmak üzere, sindirim sistemi, sinir

sistemi, karaciğer ve böbrek gibi bazı organlar yeterince gelişmemiş olabildiğinden hastalıklara karşı önemli hassasiyetleri vardır (Bleul, 2009; Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2007; Yıldız vd., 2019). Prematüre buzağılarda ilk yapılacak işlemler aşağıda sunulmuştur.

A. Prematüre buzağılarda bakım

İlk yapılacak işlem buzağının üst solunum yollarının temizlenerek solunum yapmasını sağlamak

Prematüre buzağı doğumlarında ilk etapta elektrikle çalışan veya manuel vakumlu pompalarla burun, ağız ve farenksteki mukus temizlenmelidir. Basit pompa işlemi ile solunum yolunda biriken sıvı ve mukuslar uzaklaştırılabilir ya da sıvının akmasını sağlayacak kadar (en fazla 1 dakika) buzağı arka bacaklardan başı aşağıya gelecek tarzda asılabilir (Bleul, 2009; Ok vd., 2020; Uystepuyt vd., 2002; Yıldız vd., 2017). Bu işlemin uzun tutulmamasının nedeni, interkostal kasları tam olarak gelişmeyen prematüre buzağının solunum yükünün çok fazla olduğu ve bu yükü diyaframla kompanze etmeye çalıştığı, oraya yapılacak uzun süreli baskıların solunumun kötüye gitmesine neden olabileceğidir. Yukarıda sözü edilen uygulamalarla solunumunu başlatılamayan prematüre buzağılara solunum merkezini uyarmak için başın arkasına soğuk su dökme, burun kanatlarını çimdikleme ya da solunum uyarıcı ilaçlar (doksapram, lobelin vb.) yapılmalıdır (Divers, 2008; Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Zerbe vd., 2008).

Prematüre doğan yavruların çoğunluğunda vücut ısısı düşük, yani hipotermiktir

Prematüre buzağının hipotermik olup olmadığı derhal belirlenmelidir. Hipotermi, termometre ile vücut ısısı ($<35\text{ C}^\circ$) ölçülerek belirlenebildiği gibi, termometre olmadığı zaman ağız sıcaklığına göre de belirlenebilir. Prematüre buzağılar doğum sonrası hipotermiye karşı vücut ısılarını normal sınırlarda tutmak için çok fazla enerji harcamaktadırlar. Bu durum kahverengi

yağ dokusundan yoksun olan prematüre buzağılarda ciddi enerji eksikliğine zemin hazırlayacaktır. Normal buzağılar, vücut ısılarını normal seviyelere çekmeyi başarılarken, prematüre buzağılar başaramazlar, hipotermi devam eder, bundan dolayı vücut önemli zarar görür. Prematüre buzağılarda enerji sarfiyatını en aza indirmek ve hayatı tehdit eden hipotermiden zarar görmemesi için, buzağının bulunduğu yerdeki soğuk cisimler ve altlıklar uzaklaştırılmalı, hava sirkülasyonu riski azaltılmalı, buzağı en kısa sürede havlu veya saç kurutucu ile kurutulmalıdır (Figür 4).



Figür 4. Havlu ile tüylerin kurutulması (Ok 2020).

Prematüre buzağılar özel odaya alınmalı, oda ısıtıcılarla ısıtılmalı (Figür 5) ve vücut ısısı normal düzeye gelinceye kadar buzağının üzeri havlu veya battaniye ile örtülmelidir.



Figür 5. Odanın ısıtıcı ile ısıtılması (Ok 2020).

Prematüre buzağlar, özel odada en az 3-4 gün tutulmalıdır. Bu süre içinde özel oda günde bir kez dezenfekte edilmelidir (Bluel vd., 2009; Lammoglia vd., 1999; Ok vd., 2020; Satar, 2004; Uystepruyst vd., 2002; Yıldız vd., 2017).

Prematüre buzağların solunumunun düzenli hale getirilmesi

Soluk alışverişinin daha rahat sağlanabilmesi için buzağı sternal, yani göğüs üzeri pozisyonda tutulmalıdır (Figür 6).



Figür 6. Buzağların özel yatakta göğüs üzerinde tutulması (Ok 2020).

Göğüs üzeri pozisyonda yatan buzağların, sağ veya sol yan pozisyonda yatanlara göre göğüs, diyafram ve akciğerlerinin daha az stres altında kaldığı, soluk alışverişinin daha rahat yapıldığı ve daha iyi oksijen karbondioksit değişiminin olduğu belirlenmiştir (Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019; Ok vd., 2020). Bu nedenle prematüre buzağların göğüs üzeri pozisyonda tutulması önerilmektedir. Prematüre buzağları göğüs üzeri pozisyonda tutmanın en önemli yolu özel tasarlanmış yatakla olur (Figür 6). Şayet bu pozisyonda tutmak mümkün değilse, kısa aralıklarla pozisyonun sağa-sola değiştirilmesinde fayda vardır (Bluel vd., 2009; Uystepruyst vd., 2002). Bizim çalışmalarımızda da RDS'li prematüre buzağlarda göğüs üzerine yatırılanlarda (Figür 6) solunumun düzenli hale geldiği, RDS bulgularının ortadan kalktığı ve buzağların hızla iyileştiğini gözlemledik (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019).

Prematüre buzağlara solunum desteği ve oksijen uygulaması yapılmalıdır

Prematüre buzağlarda solunum desteği çok önemlidir. Solunum desteği, oksijen uygulamasından mekanik ventilasyona kadar değişmektedir. Oksijen, hayat için vazgeçilmez bir maddedir, ancak aynı zamanda doğadaki en toksik maddelerden biridir. Tüm canlılarda antioksidan sistemlerin bulunması, oksijenin toksik etkilerine karşı konulması için var olan en ciddi önlemdir. Oksijen tedavisinin temel amacı; doku hipoksisini önleme veya azaltma, solunumu kolaylaştırma ve kalp stresini minimuma indirmektir (Figür 7).



Figür 7. Prematüre buzağıya oksijen tedavisi (Ok 2020).

Diğer bir deyişle, PaO₂'ı 80 mmHg civarında tutabilecek minimum oksijen miktarını hastaya vermektir (Figür 8) (Bluel, 2009; Ovalı, 2007; Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017).

Prematüre buzağlarda diğer bir problem hipoglisemidir

Hipoglisemi kan şekerinin düşük olmasıdır. Prematüre buzağlarda kan glikoz düzeyi çoğunlukla 30 mg/dL'nin altındadır. Hipoglisemik buzağlarda sinirsel bulgular ortaya çıkar. Hipoglisemiye ortadan kaldırmak için damar içi yolla glikoz verilmesi gerekir.

Ayrıca glikozla birlikte B vitamin uygulanması glikozun hızlı enerjiye dönüşüp organizmada kullanılmasına yardımcı olur (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019).



Figür 8. Oksijen tedavisi (Ok 2020).

Prematüre buzağuların beslenmesi

Prematüre buzağuların beslenmesi çok zordur ve fazla özen gösterilmesi gereken bir durumdur. Prematüre buzağuların genelinde emme refleksi yetersizliği söz konusu olduğundan anne memesini veya biberonu ememezler. Bu yüzden, buzağılarda emme refleksi kontrolü yapılmalıdır. Emme refleksi kontrolünde buzağının ağzına parmakları soktuğunuzda, parmakları emmeye çalışması refleksin olduğu anlamına gelir. Emme refleksi olan buzağılara biberonla kolostrum (ağız sütü) verilebilir. Kolostrum buzağılara emme refleksi oluşuncaya kadar sonda ile emme refleksi oluşuktan sonra biberonla verilmelidir. Buzağılara verilecek kolostrum miktarı 500 mL'yi geçmemelidir. 6 saat arayla 500 mL kolostrum verilmelidir. Bir öğünde 500 mL'den fazla kolostrum verildiğinde karın şişliğine ve solunum güçlüğüne neden olarak ölüme sebebiyet verebileceği unutulmamalıdır (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019).

B. Prematüre buzağulara uygulanabilecek standart tedavi ve özel tedaviler

Standart tedaviler

Prematüre buzağuların standart tedavisi çoğunlukla destek tedaviden ibarettir. Destek tedavi olarak mineral ve vitamin, antibiyotik ve sıvı-elektrolit anormalliklerinde parenteral sıvı verilir. Mineral ve vitamin olarak kalsiyum, fosfor, selenyum, A, B, C, D ve E vitaminleri uygulanabilir. Kalsiyum, fosfor, C ve B vitaminleri günde bir kez 3 gün süreyle, selenyum ve A, D, E vitamini bir kez kas içi uygulanabilir. Özellikle prematüre buzağuların çoğunluğunda gaströzefagiyal reflü belirlenmiştir (Güzelbekteş vd., 2012). Bu yüzden, reflüye yönelik 10 mg/kg dozunda eritromisin günde bir kez, 5 mg/kg raniditin günde iki kez 3-5 gün süreyle uygulanmasında fayda vardır. RDS'li prematüre buzağılarda kan gazı analizlerinde çoğunlukla miks asidozis ve hipoglisemi belirlenir. Bu yüzden, miks asidozis durumunda sıvı solüsyonu olarak 250-500 mL % 1,3'lük NaHCO₃'lü veya laktat ringerli serumlar tercih edilmelidir. Hipoglisemik buzağılarda 100-250 mL %5'lik dekstroz uygulaması oldukça başarılı sonuç vermektedir (Çorum vd., 2019a; Çorum vd., 2019b; Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017; Yıldız vd., 2019).

Akciğere yönelik özel tedaviler

Respiratorik distres sendromlu prematüre buzağılarda en etkin tedavi, akciğerin iyileşmesine yönelik yapılan özel tedavidir. Akciğere yönelik tedavinin temel amacı; akciğer gelişimini sağlamak, dokuların gaz alışverişini kolaylaştırmak, solunumun devamlı ve düzenli hale gelmesini sağlamaktır. Akciğer yönelik tedavi, oksijen tedavisi ve inhaler tedaviden oluşur. Oksijen tedavisi hipoksemiye ortadan kaldırmak oldukça etkilidir. İnhaler tedavi ise akciğerin gelişimini ve yangıyı ortadan kaldırarak gaz alışverişini kolaylaştırmak ve solunumu düzenli hale getirmede oldukça faydalı bir tedavi yöntemidir. Akciğerin gelişimine ve yangıyı ortadan kaldırarak gaz

alışverişini kolaylaştırmak amacıyla sürfaktan veya inhaler bronkodilatatörler, yangı ve ödem gidericiler kullanılır (Bleul, 2009, Ok vd., 2020, Ovalı, 2007, Pekcan, 2012, Yıldız vd., 2017).

Sürfaktan tedavisi

Beşeri hekimlikte RDS'li prematüre doğan bebeklere ekzojen sürfaktan tedavi veya profilaktik amaçlı kullanılmaktadır. Sentetik ve doğal formları bulunan sürfaktan RDS dışında mekonyum aspirasyon sendromu gibi başka hastalıklarda da kullanılabilir. Sürfaktan endotrakeal tüp içine yerleştirilen sonda aracılığıyla veya endotrakeal tüpün proksimal ucuna yerleştirilmiş bir adaptör yardımı ile prematüre yavrunun akciğerine uygulanmaktadır (Kültürsaray ve Tansuğ, 2000; Yurdakök, 1991). Beşeri hekimlikte RDS'li prematüre bir bebeğin tedavisinde kullanılan sürfaktan maliyeti 5.000-10.000 dolar civarındadır, bu yüzden Veteriner Hekimlikte ticari sürfaktan preparatlar ekonomik olmadığından kullanılma şansı yoktur (Altuğ vd., 2013, Yıldız vd., 2017). Veteriner hekimlikte kesilen genç sığır akciğerlerinden elde edilen sürfaktan maddeleri kullanılabilirdiği ifade edilmektedir. Karapınar vd., (2008) kesim sonrası genç sığır akciğerlerinden elde ettikleri sürfaktan ekstresini sternal pozisyonda yatan RDS'li prematüre buzağlara 100 mg/kg/CA dozunda intratrakeal uygulamışlar ve başarılı sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir.

İnhaler tedavi

Beşeri hekimlikte respiratorik distres sendromlu hastalarda inhaler ilaç uygulamaları akciğer fonksiyonunun kısa sürede normale dönmesine önemli katkı sağladığı ortaya konmuştur. Bronkodilatatörler, yangı gidericiler, diüretikler ve antibiyotikler inhaler yolla kullanılmaktadır. Nebulizasyon (inhalasyon) sıvı durumdaki ilacın, nebulizatör aracılığıyla buharlaştırılarak solunum yollarına verilmesi işlemine denir (Pekcan, 2012). Veteriner hekimlikte inhaler ilaçlar at ve pet hekimliğinde kullanılmakla birlikte çiftlik hayvan hekimliğinde kullanımı oldukça sınırlıdır. Yapmış olduğumuz

çalışmalarda (Ok vd., 2020, Yıldız vd., 2017) RDS'li prematüre buzağların tedavisinde nebulizer yolla bronkodilatatörler, yangı gidericiler ve diüretik uygulamalarının başarılı (%70-78) sonuç verdiğini belirledik (Figür 9).



Figür 9. RDS'li prematüre bir buzağıya nebulizer cihazı ile inhaler ilaç verilmesi (Ok 2020).

RDS prematüre buzağlarda inhaler kullanılan ilaçların bir buzağı için maliyeti yaklaşık 6-7 dolar civarında olması oldukça ekonomik olduğu göstermiştir. Son yıllarda hem beşeri hem de veteriner hekimlikte inhalasyon yoluyla ilaç kullanımı, lokal ve hızlı etki sağlamanın yanı sıra, sistemik yan etkilerinin azlığı nedeniyle akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanım alanı gittikçe artmıştır. İnhaler uygulamanın non-invaziv, kısa sürede etkinin başlaması ve düşük dozlarda etkili olması oral veya parenteral yolla uygulamaya göre en önemli avantajıdır (Ok vd., 2020, Pekcan, 2012, Yıldız vd., 2017). Bununla birlikte inhaler yolla verilen ilaçlar, yan etkilerinden uzak durularak hızlı şekilde ve istenilen miktarda akciğere ulaşmaktadır. İnhaler yolla verilen bronkodilatatörlerin 5 dakika içinde etkinliği başlayıp 15-30 dakika içinde pik seviyeye ulaşırken, oral uygulamalarda ilacın pik seviyeye ulaşması 2-3 saat almaktadır (Duvivier vd., 1997).

İnhaler olarak verilen kortikosteroid, bronkodilatatör ve diüretikler, akciğerdeki yangı, bronş kasılmalarını ve ödemi çözerek gaz alışverişini kolaylaştırarak solunum fonksiyonunun hızla normale dönmesi sağlar. İnhaler yolla bronkodilatatör olarak β_2 adrenerjik

agonistler ve antikolinergikler kullanılır, β_2 -agonisti bronkodilatörler, kısa ve uzun etki göstermesine göre iki gruba ayrılır. Kısa etki gösterenler; metaproterenol, salbutamol, terbutalin ve fenoterol grubu bronkodilatörlerdir. Uzun etkili β_2 -agonisti bronkodilatörlerin en yaygın kullanılanı salmeterol ve formeteroldür (Barnes, 2008; Traş vd., 2012). Kortikosteroidler, solunum yolu hastalıklarında nebulizasyon yoluyla sıklıkla kullanılmaktadır. Nebulizer yöntemle uygulanan kortikosteroidler; sürfaktan üretimini artırmanın yanında, akciğer hasarında yangıyı azaltma, bronşiyal ve pulmoner ödemi azaltarak hastanın solunumunu düzenleyerek iyileşmesine katkı sağlamaktadır (Traş vd., 2012; Yıldız vd., 2017). Kortikosteroidler, akciğer hastalıklarında yangıyı azaltma, antioksidant enzim ve sürfaktan üretimini artırma, bronşiyal ve pulmoner ödemi azaltma amacıyla kullanılmaktadır (Bancalari vd., 2005). Steroidlerin inhalasyon yoluyla kullanılması, sistemik kullanımlarda ortaya çıkan yan etkileri minimuma indirmektedir. Flutikazone propiyonat, beklametazone dipropiyonat, triamskinolon, budosenid, flunisolid gibi steroidlerin inhaler formları bulunmaktadır (Mazzaferro, 2006; Robinson vd., 2009). Bu ilaçlar içinde flutikazon propiyonatın terapötik etkisi en yüksektir (Barnes, 1998). Tayların solunum yolu hastalıkları ve atların astım hastalığındainhaler kortikosteroid, bronkodilatör, antibiyotik ve mukolitik uygulamışlar ve başarılı sonuç elde etmişlerdir (Leclere vd., 2010; Morrese, 2008). İnhaler yolla uygulanan bir ilaç grubu da diüretiklerdir. Diüretikler, akciğerin intersitisyel ödemi azaltmak, pulmoner vasküler direnci düşürmek (hipertansiyonu azaltma), gaz değişimini kolaylaştırmak ve akciğer hücreleri oksijen tüketimini azaltıp, oksijenin dolaşıma geçişini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Abman ve Groothuis, 1994). Bu amaç için en yaygın kullanılan diüretik furosemittir (Ok vd., 2020; Yıldız ve Ok, 2017). Yıldız ve Ok, (2017) ve Ok vd., (2020) RDS'li prematüre buzağılara inhaler yolla bronkodilatör (salbutamol,

formeterol) kortikosteroid (flutikazon, budesonid) ve diüretik (furosemid) uygulamışlar ve tedavide oldukça başarılı sonuç almışlardır.

İlaçların inhalasyon dozu

- Flutikazon'un nebulizer formu, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozunda 2.5 mL serum fizyolojik solüsyonu ile sulandırılarak 12 saat arayla 3 gün süreyle nebulizasyon yöntemi ile 5 dakika içinde uygulanır (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017).
- Budesonid'in nebulizer formu nebulizasyon yöntemi ile 400 μg total doz 2,5 mL serum fizyolojik solüsyonu ile sulandırılarak 12 saat arayla 3 gün süreyle 5 dakika içinde uygulanır.
- Salbutamol'un nebulizer formu 0.025 mg/kg dozunda 6 saat arayla 2,5 mL serum fizyolojik solüsyonu ile sulandırılarak 3 gün süreyle nebulizasyon yöntemi ile 5 dakika içinde uygulanır (Yıldız vd., 2017).
- Formoterol'un nebulizer formu 12 μg total dozda 12 saat arayla 2.5 mL serum fizyolojik solüsyonu ile sulandırılarak 3 gün süreyle nebulizasyon yöntemi ile 5 dakika içinde uygulanır (Morrese, 2008; Ok vd., 2020).
- Furosemid'in parenteral formu 1 mg/kg dozunda 2.5 mL serum fizyolojik solüsyonu ile sulandırılarak 12 saat arayla 3 gün süreyle nebulizasyon yöntemi ile 5 dakika içinde uygulanır (Ok vd., 2020; Sahni ve Phelps, 2011; Yıldız vd., 2017).

C. Oksijen desteği

Solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde en önemli katkıyı oksijen tedavisi sağladığı unutulmamalıdır. Yapmış olduğumuz çalışmalarda (Ok vd., 2020; Yıldız vd., 2017) respiratorik distres sendromlu prematüre buzağılara oksijen uygulamasının tedaviye ciddi katkı sağladığını müşahade ettik. Hastanelerde kurulan oksijen ünitelerinde oksijen ve karbondioksit belirli oranlarda olduğundan insan ve hayvanlara sürekli oksijen verilebilmektedir. Şayet bu ünite mevcut değilse, sanayi tipi oksijen

tüpünden faydalanılabilir. Sanayi tipi oksijen tüpündeki oksijen buzağlara uygun oksijen maskesi (Figür 7; Figür 8) yardımı ile verilebilir. Buzağlara oksijen başlangıç olarak 5-6 L/dk akış hızıyla intranasal olarak 15'er dakika süreyle uygulanır, her uygulamadan sonra 10 dakika ara verilir. Her uygulamadan sonra 10 dakika ara verilmesinin nedeni saf oksijenin yoğun verilmesi toksik etki göstermesidir. Bu uygulama yaklaşık 3 saat kadar sürdürülür. Üç saat sonra oksijen akış hızı 3-4 L/dk'ya düşürülür. Oksijen tedavisine birkaç gün belirli aralıklarla devam edilebilir. Oksijen tedavisine son verilmesi şartı arteriyel SatO₂ düzeyinin > % 80 mmHg üzerine çıkmış olmasıdır (Bleul, 2009; Korkmaz, 2003; Ok vd., 2020; Palmer vd., 1996; Yıldız vd., 2017).

AÇIKLAMALAR

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

KAYNAKLAR

- Abman, S. H., Groothuis, J. R. (1994).** Pathophysiology and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Clinics of North America*, 41(2), 277-315. doi: 10.1016/s0031-3955(16)38726-0.
- Altuğ, N., Basbuğan, Y., (2013).** Prematüre buzağı. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 4(1), 53-61.
- Aydogdu, U., Yıldız, R., Guzelbektes, H., Coskun, A., Sen, I. (2016).** Cardiac biomarkers in premature calves with respiratory distress syndrome. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(1), 38-46. doi: 10.1556/004.2016.004.
- Bancalari, E., Wilson-Costello, D., Iben, S. C. (2005).** Management of infants with bronchopulmonary dysplasia in North America. *Early Human Development*, 81(2), 171-9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2004.12.005.
- Barnes, P. J. (1998).** Current issues for establishing inhaled corticosteroids as the antiinflammatory agents of choice in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(4-2), 427-33. doi: 10.1016/s0091-6749(98)70154-x.
- Bleul, U. (2009).** Respiratory distress syndrome in calves. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 25(1), 179-93. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.002.
- Coskun, A., Şen, I., Guzelbektes, H., Ok, M., Turgut, K., Canikli, S. (2010).** Comparison of the effects of intravenous administration of isotonic and hypertonic sodium bicarbonate solutions on venous acid-base status in dehydrated calves with strong ion acidosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(10), 1098-103. doi: 10.2460/javma.236.10.1098.
- Çelik, E., Sen, I., Güzelbektes H. (2016).** Konya'nın Akşehir, Ilgın ve Kadınhanı İlçelerindeki perinatal buzağı mortalite prevalansı. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(2), 22-28.
- Çorum, O., Altan, F., Yıldız, R., İder, M., Ok, M., Üney, K. (2019a).** Pharmacokinetics of enrofloxacin and danafloxacin in premature calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(6), 624-31. doi: 10.1111/jvp.12787.
- Çorum, O., Yıldız, R., İder, M., Altan, F., Ok, M., Üney, K. (2019b).** Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome and ceftriaxone in premature calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(6), 632-39. doi: 10.1111/jvp.12789.
- Divers, T. J. (2008).** Diseases of dairy cattle (2nd ed.). Saunders Elsevier.
- Duvivier, D. H., Votion, D., Vanden, P. S., Lekeux, P. (1997).** Aerosol therapy in the equine species. *Veterinary Journal*, 154(3), 189-202. doi: 10.1016/s1090-0233(97)80020-2.
- Fluegel-Dougherty, A. M., Cornish, T. E., O'Toole, D., Boerger-Fields, A. M., Henderson, L. O., Mills, K. W. (2013).** Abortion and premature birth in cattle following vaccination with Brucella abortus strain RB51. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), 630-5. doi: 10.1177/1040638713499570.
- Gundelach, Y., Essmeyer, K., Telscher, M. K., Hoedemaker, M. (2009).** Risk factors for perinatal mortality in dairy cattle: Cow and foetal factors, calving process. *Theriogenology*, 71(6), 901-9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.011.
- Gül, Y., Baykalır, B. (2013).** Serum β-carotene and vitamin A levels in spontaneous premature calves with respiratory distress syndrome. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(6): 1029-33. doi: 10.9775/kvfd.2013.9398.
- Güzelbektes, H., Coskun, A., Ok, M., Aydogdu, U., Sen, I. (2012).** Prevalence of gastroesophageal reflux disease in premature calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(4), 1051-55. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00934.x.
- Irmak, K., Turgut, K. (2011).** The evaluation of coagulation profiles in spontaneous premature calves with respiratory distress syndrome. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2), 197-201. doi: 10.1007/s11259-006-3258-8.
- Johanson, J. M., Berger, P. J. (2003).** Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3745-55. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73981-2.

- Karapınar, T., Dabak, M. (2008).** Treatment of premature calves with clinically diagnosed respiratory distress syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 462-6. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0074.x.
- Koterba, A., Madigan, J. E. (2009).** Manifestations of diseases of the neonate. In P. S. Bradford (Eds.), *Large Animal Internal Medicine* (pp.455-66).
- Korkmaz, A. (2003).** Respiratory distress syndrome. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Science*, 9(1), 18-24.
- Kornmatitsuk, B., Franzén, G., Gustafsson, H., Kindahl, H. (2003).** Endocrine measurements and calving performance of swedish red and white and swedish holstein dairy cattle with special respect to stillbirth. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(1-2), 21-33. doi: 10.1186/1751-0147-44-21.
- Kültürsay, N., Tansuğ, N. (2000).** Sürfaktan ve neonatal respiratuvar distres sendromunda ekzojen sürfaktan kullanımı. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(2), 47-52.
- Lammoglia, M. A., Bellows, R. A., Grings, E. E., Bergman, J. W., Short, R. E., MacNeil, M. D., (1999).** Effects of feeding beef females supplemental fat during gestation on cold tolerance in newborn calves. *Journal of Animal Science*, 77(4), 824-34. doi: 10.2527/1999.774824x.
- Leclere, M., Lefebvre-Lavoie, J., Beauchamp, G., Lavoie, J. P. (2010).** Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Veterinary Journal*, 42(4), 316-21. doi: 10.1111/j.2042-3306.2009.00022.x.
- Macfarlane, J., Walker, B. (2007).** Pregnancy toxemia in beef cattle. *Primefact*, 335, 1-3.
- Mazzaferro, E. M. (2006).** Inhalation therapy: New approaches to old diseases. *Small Animal And Exotics: North American Veterinary Conference, USA, 20(1)*, 275-276.
- Meyer, C. L., Berger, P. J., Koehler, K. J., Thompson, J. R., Sattler, C. G. (2001).** Phenotypic trends in incidence of stillbirth for Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 515-23. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74502-X.
- Morresey, P. R. (2008).** How to deliver respiratory treatments to neonates by nebulization. *AAEP Proceedings (54th) San Diego, CA, USA*, 54, 520-26.
- Ok, M. (2020).** Prematüre (Günsüz) doğan buzağların bakımı. H. Erdem, E. Çiftçi, K. Işık, M. Ü. Yorgancılar, C. Yaralı (Eds), *Buzağı Sağlığı ve Yetiştiriciliği*. (pp. 44-48). Medisan Yayınevi
- Ok M., Yıldız, R., Traş, B., Başpınar, N., Akar, A. (2020).** Effect of nebulized formeterol, ipratropium bromid, and furosemid in combination with fluticasone propionate on arterial blood gases premature calves with respiratory distress syndrome. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(1), 2011-2018. doi: <https://doi.org/10.12681/jhvms.22949>
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, U., Sen, I., Gündüz, K., Birdane, M. F., Güzelbekteş, H. (2009).** The studies on the etiology of diarrhea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of Escherichia coli strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56(2), 94-101. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x.
- Ok, M., Birdane, F.M., Sen, I., Guzelbektes, H. (2000).** Study on some blood biochemical parameters in premature calves. *The Indian Veterinary Journal*, 77(10), 859-61.
- Ortataı, M., Çiftçi, M. K. (1996).** İnsan ve hayvanlarda akciğer sürfaktan sistemi ve önemi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 12(1), 117-21.
- Ovalı, F. (2007).** Solunum sıkıntısı ve respiratuvar distres sendromu. In T. Dağoğlu, & F. Ovalı (Eds), *Neonatoloji*. (pp. 331-346).
- Palmer, M. V., Cheville, F., Jensen, A. E. (1996).** Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate brucella abortus strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Veterinary Pathology*, 33(6), 682-91. doi: 10.1177/030098589603300607.
- Pekcan, S. (2012).** Çocuklarda inhaler tedavi uygulamaları. *Solumum*, 14(2), 63-72.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007).** Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses (10th ed.). *Saunders Elsevier*.
- Robinson, N. E., Berney, C., Behan, A., Derksen, F. J. (2009).** Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1247-53. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0382.x.
- Sahni, J., Phelps, S. J. (2011).** Nebulized furosemide in the treatment of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 16(1), 14-22.
- Satar, M. (2004).** Neonatal hipoglisemi ve hiperglisemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Science*, 2(7), 787-91.
- Sen, I., Ok, M., Altunok, V., Çoşkun, A., Constable, P. D. (2009).** Efficacy of oral rehydration therapy solutions containing sodium bicarbonate or sodium acetate in treating calves with naturally acquired diarrhea, moderate dehydration, and strong ion acidosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(7), 926-34. doi: 10.2460/javma.234.7.926.
- Sheldon, I. M., Barrett, D. C., Boyd, H. (2004).** The Postpartum Period. In A. H. Andrews (Eds.), *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. (pp. 508-527).
- Traş, B., Yazar, E., Elmas, M. (2012).** *Veteriner İlaç* (1th ed.).

- Uystepruyst, C., Coghe, J., Dorts, T., Harmegnies, N., Delsemme, M. H., Art, T., Lekeux, P. (2002).** Sternal recumbency or suspension by the hind legs immediately after delivery improves respiratory and metabolic adaptation to extra uterine life in newborn calves delivered by caesarean section. *Veterinary Research*, 33(6), 709-24. doi: 10.1051/vetres:2002051.
- Warner, A. E. (2009).** The Respiratory System In B. P. Smith (Eds), *Large Animal Internal Medicine* (pp. 489-545).
- Yıldız, R., Ok, M., Ider, M., Akar, A., Nasari, A., Koral, E. (2019).** The changes in biomarkers for necrotising enterocolitis in premature calves with respiratory distress syndrome. *Veterinarni Medicina*, 64(10), 440-47. <https://doi.org/10.17221/37/2019-VETMED>
- Yıldız, R., Ok, M., Ider, M., Aydoğdu, U., Naseri, A., Parlak, K., Gülersoy, E. (2018).** Evaluation of intestinal damage biomarkersin calves with atresia coli. *Journal of Veterinary Research*, 62(3), 379-84. doi: 10.2478/jvetres-2018-0054
- Yıldız, R., Aydogdu, U., Guzelbektes, H., Coskun, A., Sen, I. (2017)** Venous lactate, pH and partial pressure of carbon dioxide levels as prognostic indicators in 110 premature calves with respiratory distress syndrome. *Veterinary Record*, 180(25), 611-16. doi: 10.1136/vr.103730.
- Yıldız, R., Ok, M. (2017).** Clinical efficacy of combinations of nebulised fluticasone, salbutamol and furosemide on lung function in premature calves with respiratory distress syndrome. *Veterinarni Medicina*, 62(10), 541-52. <https://doi.org/10.17221/34/2017-VETMED>
- Yurdakök, M. (1991).** Respiratuvar distres sendromu ve ventilatör tedavisinin ilkeleri. *Katkı Pediatri Dergisi Neonatal Respiratuvar Distres Özel Sayısı*, 299-370.
- Zerbe, H., Zimmermann, D. K., Bendix, A. (2008).** Neonatal asphyxia in calves: diagnosis, therapy and prophylaxis. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 36(3), 163-69.