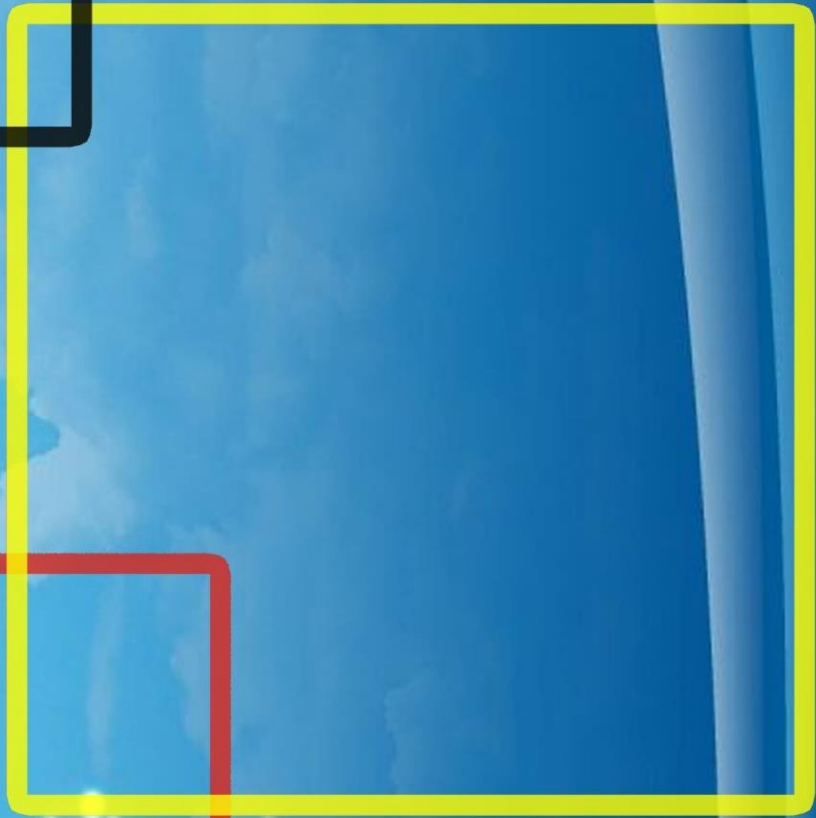




VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2022 / Volume: 33 / Issue: 3

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





November - 2022



VAN VETERINARY JOURNAL

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

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Musa GENÇCELEP (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Cumali ÖZKAN

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

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

Editors (Editorial Board)

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

Publication Board

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

Advisory Board

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

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

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

| Year | Volume | Issue |
|------|--------|-------|
| 2022 | 33 | 3 |

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Türkiye Atf Dizini



November - 2022



VAN VETERINARY JOURNAL

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

Scientific Board of This Issue

| | |
|--|---|
| Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU (Ankara University) | Assoc. Prof. Dr. Funda EŞKİ (Cukurova University) |
| Prof. Dr. Aytakin GÜNLÜ (Selcuk University) | Assoc. Prof. Dr. Halil YALÇIN (Burdur Mehmet Akif Ersoy University) |
| Prof. Dr. Basak HANEDAN (Ataturk University) | Assoc. Prof. Dr. Neşe Hayat AKSOY (Aksaray University) |
| Prof. Dr. Loğman ASLAN (Van Yuzuncu Yil University) | Assoc. Prof. Dr. Ramazan İLGÜN (Aksaray University) |
| Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI (Kirkkale University) | Assoc. Prof. Dr. Yıldırım BASBUGAN (Van Yuzuncu Yil University) |
| Prof. Dr. Meryem EREN (Erciyes University) | Assist. Prof. Dr. Ali GÜLAYDIN (Siirt University) |
| Prof. Dr. Mustafa İSSİ (Firat University) | Assist. Prof. Dr. Emine ÇATALKAYA (Dicle University) |
| Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Aydın Adnan Menderes University) | Assist. Prof. Dr. Emine SARMAN (Afyonkarahisar Health Sciences Univ.) |
| Prof. Dr. Savaş SARIÖZKAN (Erciyes University) | Assist. Prof. Dr. Fikret ALTINDAĞ (Van Yuzuncu Yil University) |
| Prof. Dr. Taylan AKSU (Van Yuzuncu Yil University) | Assist. Prof. Dr. Gencay EKİNCİ (Erciyes University) |
| Assoc. Prof. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU (Aksaray University) | Assist. Prof. Dr. Nüvit COŞKUN (Kafkas University) |
| Assoc. Prof. Dr. Bahattin ÇAK (Van Yuzuncu Yil University) | Assist. Prof. Dr. Rabia Mehtap TUNCAY (Van Yuzuncu Yil University) |
| Assoc. Prof. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM (Ataturk University) | Assist. Prof. Dr. Sakine Ülküm ÇİZMECİ (Selcuk University) |
| Assoc. Prof. Dr. Emre KAYA (Firat University) | Res. Assist. Dr. Mehmet Reşit KARAGEÇİLİ (Van Yuzuncu Yil University) |
| Assoc. Prof. Dr. Firat DOĞAN (Hatay Mustafa Kemal University) | |

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

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

| Year | Volume | Issue |
|------|--------|-------|
| 2022 | 33 | 3 |

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Türkiye Atf Dizini

Original Articles

- **Hatipoğlu D, Dik I, Gülersoy E.** Determination of Oxidative Stress and Antioxidant Activities in Dogs Infected with Canine Distemper Virus (Canine Distemper Virüs Enfeksiyonu Bulunan Köpeklerde Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi) **67-70**
- **Ayvazoğlu C, Ayvazoğlu Demir P.** Bovine Ephemeral Fever in Turkey and Its Economic Effect (Türkiye'de Üç Gün Hastalığı ve Ekonomik Boyutu) **71-75**
- **Kaya S, Koçak G.** Üreme Mevsimindeki Romanov Koyunlarında Senkronizasyon Protokolü ile Birlikte D Vitamini Enjeksiyonunun Bazı Üreme Parametreleri Üzerine Etkisi (Effect of Vitamin D Injection with Synchronization Protocol on Some Reproductive Parameters in Romanov Sheep in Breeding Season) **76-79**
- **Kibar M, Zhunushova A, Öztürk Z.** Kedilerde Medetomidin/Ketamin ve Ksilazin/Ketamin Anestezisinin Kardiovasküler Fonksiyonlar Üzerindeki Etkilerinin ve Atipamezol ile Geri Dönüşümünün Karşılaştırılması (Comparison of the Effects of Medetomidine/Ketamine and Xylazine/Ketamine Anesthesia and Its Reversal by Atipamezole on Cardiovascular Functions in Cats) **80-85**
- **Özdek U, Yörük İH, Değer Y.** The Effect of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Serum Mineral and Vitamin Levels in Rats with Experimental Fluorosis (Deneyisel Florozis Oluşturulan Ratlarda Serum Mineral ve Vitamin Seviyeleri Üzerine Kitosan ile Kitosan Oligosakkaritin Etkisi) **86-91**
- **Erhan Baycumendur F, Ergun L.** Broiler Tavuklarda ve Japon Bildircinlarında Karaciğer Bağ Doku Liflerinin Histolojik Olarak İncelenmesi (Histological Examination of Liver Connective Tissue Fibers in Broiler Chickens and Japanese Quails) **92-96**
- **Demir Y, Tuncer SS.** Hakkâri İlindeki Küçükbaş Hayvancılık İşletmelerinin Mevcut Durumu ve Genel Sorunları (Current Situation and General Problems of Small Ruminant Enterprises in Hakkâri Province) **97-105**
- **Yıldız H, Babaođlu AR.** Molecular Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus, Bovine Herpes Virus-1 and Bovine Herpes Virus-4 Infections in Abortion Cases of Cattle in Van District, Turkey (Van Yöresi Sığırlarında Bovine Viral Diyare Virus, Bovine Herpes Virus-1 ve Bovine Herpes Virus-4 Nedenli Abort Olgularının Moleküler Olarak Araştırılması) **106-111**
- **Başbuğ O, Takcı A.** Evaluation of Clinical Accuracy of Portable Glucometers in Sheep at the Beginning of the Breeding Season (Üreme Sezonu Başlangıcında Koyunlarda Portatif Şeker Ölçüm Cihazlarının Klinik Doğruluğunun Değerlendirilmesi) **112-116**
- **Yılmaz K.** Investigation of The Effect of Artemisinin Administration on Total Oxidant/Antioxidant and Oxidative Stress-Index in The Liver and Kidney Tissue of Pentylene-tetrazole-Induced Mice (Artemisinin Uygulamasının, Pentilentetrazol ile İndüklenen Farelerin Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Total Oksidan/Antioksidan ve Oksidatif Stres İndeksi Üzerine Etkisinin Araştırılması) **117-121**

Original Articles

- **Yılmaz HC, Yörük M.** The Effects of Bisphenol A on The Distribution and Heterogeneity of Mast Cells in Rat Digestive Tract (Bisphenol A'nın Rat Sindirim Kanalındaki Mast Hücrelerinin Dağılımı ve Heterojenitesi Üzerine Etkileri) **122-129**
- **Soyuçok A.** Fermantasyon ve Kurutma Boyunca Tarhana Hamurunda Meydana Gelen Organik Asit Kinetiğinin Belirlenmesi (Determination of Organic Acid Kinetics in Tarhana Dough During Fermentation and Drying) **130-134**
- **Erişçi D, Bingöl NT, Avcı A.** Elma (Malus Pumila) Katkısının Yonca Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi (The Effect of Apple (Malus Pumila) Additive on Alfalfa Silage Quality) **135-140**
- **Korkmaz M, Sancak T.** Yara İyileşmesinde Centella Asiatica Ekstraktı, Çinko Oksit ve Alaptidum İçeren Merhemlerin Etkinliğinin Klinik ve Histopatolojik Olarak Karşılaştırılması (Clinical and Histopathological Comparison of the Efficacy of Ointments Containing Centella Asiatica extract, Zinc Oxide and Alaptidum in Wound Healing) **141-148**



Determination of Oxidative Stress and Antioxidant Activities in Dogs Infected with Canine Distemper Virus

Durmuş HATİPOĞLU^{1,*} Irmak DİK² Erdem GÜLERSOY³

¹ Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selcuk, 42075 Konya, Turkey

² Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selcuk, 42075 Konya, Turkey

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Harran, 63200, Sanlıurfa, Turkey

Received: 27.06.2022

Accepted: 19.08.2022

ABSTRACT

Supraphysiological reactive oxygen species (ROS) has been linked to a variety of diseases, including cancer, inflammation, and neurodegeneration. One of the diseases pathophysiologically associated with ROS accumulation is canine distemper (CD). The purpose of this study was to compare lipid peroxidation and antioxidant biomarkers in dogs infected with canine distemper virus (CDV) to healthy dogs. The animals in this study consisted of a total of 20 dogs, 10 CDV-positive dogs (Trial group) aged 0–12 months of different breeds and sexes, and 10 healthy dogs (Control group) aged 0–12 months of different breeds and sexes. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) were evaluated with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits using serum samples. While the activities of GSH and SOD were statistically lower in CDV positive animals compared to healthy animals ($p < 0.05$), the level of TBARS was significantly higher ($p < 0.05$). In conclusion, current study findings that CDV increases lipid peroxidation activity in serum while decreasing antioxidant enzyme levels may be useful for future research.

Keywords: Antioxidants, Canine distemper virus, Lipid peroxidation.

ÖZ

Canine Distemper Virüs Enfeksiyonu Bulunan Köpeklerde Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi

Suprafizyolojik reaktif oksijen türleri (ROS), kanser, inflamasyon ve nörodejenerasyon dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Patofizyolojik olarak ROS birikimi ile ilişkili diğer hastalıklardan biri de köpek distemperidir (CD). Bu çalışmanın amacı, canine distemper virüsü (CDV) ile enfekte köpeklerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan biyobelirteçleri sağlıklı köpeklerle karşılaştırmaktır. Bu çalışmadaki hayvanlar, 0-12 aylık farklı ırk ve cinsiyetlerden 10 CDV pozitif köpek (Deneme grubu) ve 0-12 aylık farklı ırk ve cinsiyetlerden 10 sağlıklı köpek (Kontrol grubu) olmak üzere toplam 20 köpekten oluşmaktadır. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS), glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri serumdan ticari olarak temin edilebilen enzim bağlantılı immünosorbent tahlil kitleri ile değerlendirildi. GSH ve SOD aktiviteleri, CDV pozitif hayvanlarda sağlıklı hayvanlara kıyasla istatistiksel olarak daha düşük iken ($p < 0.05$), TBARS seviyesi önemli ölçüde daha yüksekti ($p < 0.05$). Sonuç olarak, CDV'nin serumdaki lipid peroksidasyon aktivitesini artırırken antioksidan enzim düzeylerini azalttığına dair mevcut çalışma bulguları gelecekteki araştırmalar için faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Canine distemper virüsü, Lipid peroxidation.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), which are formed due to the increase in oxidative stress in the cell, affect the double bonds of lipid and protein molecules as well as the double bonds of DNA bases, breaking a hydrogen atom from these and causing chain oxidation reactions to start, thereby disrupting their structure (Bedard and Krause 2007). The most crucial product formed in the last step of lipid peroxidation is malondialdehyde (MDA). MDA is one

of the end products of polyunsaturated fatty acids peroxidation in cells (Mariutti 2022). The increase in free radicals causes overproduction of MDA. The presence of oxidative damage can be detected by measuring MDA, which is released because of oxidative damage to macromolecules by the effects of free radicals in body fluids and tissues by biochemical methods (Yazıcı et al. 2021; Avci et al. 2014; Hatipoğlu and Keskin 2022). MDA can be chemically analyzed as a component of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) to assess



lipid peroxidation (Gutteridge and Halliwell 1990; Dik et al. 2019). Glutathione (GSH) is the most critical low molecular weight antioxidant synthesized in cells. It is found in all mammalian tissues, especially in the liver (Lu 2009). The decrease in the level of GSH in the cell is due to the deterioration of the oxidant/antioxidant balance due to the decline of the defense mechanism against ROS. As a result, peroxidative tissue damage occurs. (Halder et al. 2016). Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide radicals (O_2^-) to molecular oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) and provides an effective defence against oxidative stress (Wang et al. 2018). SOD is the only antioxidant enzyme that scavenges the superoxide anion by converting this free radical to oxygen and hydrogen peroxide, thus preventing peroxynitrite production and further damage (Radi 2018).

Although physiological (beneficial) ROS confer several advantages in living organisms as signaling molecules, supraphysiological (harmful) ROS can cause harmful effects leading to oxidative damage to lipids, proteins, carbohydrates, RNA, and DNA. (Stuart et al. 2018; Sies and Jones 2020). Supraphysiological ROS has been associated with various diseases, including cancer, inflammation, and neurodegenerative diseases (Wang et al. 2021). One of the diseases pathophysiologically associated with ROS accumulation is canine distemper (CD) (Vandeveld and Zurbriggen 2005; Mahajan et al. 2018). CD caused by canine distemper virus (CDV) is a viral infection that affects the digestive, respiratory and central nervous systems (Beineke et al. 2009). CD is a severe immunosuppressive and neurological illness characterized by widespread demyelination lesions in the central nervous system's grey and white matter (Beineke et al. 2009). It is stated that these lesions are induced by virus replication and severe oxidative stress (Vandeveld and Zurbriggen 2005; Karadeniz et al. 2008) associated increased plasma concentrations of oxidative stress biomarkers with supraphysiological ROS accumulation, leading to disruption of antioxidant systems during CD. (Karadeniz et al. 2008).

This study aimed to determine lipid peroxidation and antioxidant biomarkers in dogs infected with canine distemper virus and compare them with healthy dogs.

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was approved by the Ethics Committee (Veterinary Faculty, Selcuk University, Konya, Turkey, Decision No: 2020-124).

The animal material of this study consisted of 20 dogs in total which were brought to Animal Hospital either for diagnosis and/or treatment and routine check-up and/or vaccination purposes. All were aged between 0 and 12 months, unvaccinated client-owned mixbreed dogs. Anamnestic data revealed that clinical findings including nasal and ocular discharge, wheezing, and neurological symptoms such as tremors, myoclonus and chewing gum fits that would suggest the presence of CDV infection were present for at least 7 days.

The inclusion criteria of dogs suspected of being infected with CDV were based on anamnestic data, clinical examinations and rapid diagnostic test application results. To confirm suspicion of CDV infection, both ocular and nasopharyngeal secretions were obtained with sterile wet swabs and CDV antigen (Ag) test (Asan Easy Test CDV Ag®, ASAN Pharm. Co., Ltd. Gyeonggi-do Korea, relative

sensitivity: 97.96%, relative specificity: 97.50%) was performed according to the manufacturer's instructions. Also, in order to rule out any concurrent diseases, Canine Adenovirus 2, Canine Influenza virus, Canine Coronavirus Ag (Asan Easy Test CAV² / CIV / CCV Ag®, ASAN Pharm. Co., Ltd. Gyeonggi-do Korea, relative sensitivity: 93.10%, relative specificity: 97.50%) tests were performed on all the dogs. All test results were determined to be negative. Moreover, microscopic fecal examinations of all dogs were performed with an appropriate method (zinc sulfate centrifugal flotation method for *Isoospora* spp., centrifugal flotation method with a solution of sodium nitrate ($NaNO_3$, SG=1.32) for *Toxocara canis* and other parasite eggs), and all were determined to be negative as well. As a result, dogs with positive nasal/ocular CDV Ag test results were included in the Trial Group (n=10). Dogs with normal clinical findings and negative CDV, CAV², CIV, CCV Ag test results were considered healthy and included in the Control Group (n=10).

TBARS (TBARS Assay Kit, Cat. No: E0132Ca, BT LAB, China), GSH (Cat No: EA0021Ge, BT LAB, China) and SOD (Item No: 706002, Cayman USA) were evaluated with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits using serum samples extracted from blood samples obtained using a jugular venepuncture technique from dogs with CDV and healthy dogs. Measurements were performed on an enzyme-linked immunosorbent assay reader (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data analysis was evaluated using SPSS 25.00 (SPSS for Windows®) statistical software and one sample Kolmogorov-Smirnov test was applied to determine whether all data were parametric or non-parametric. Data were evaluated using analysis of variance and a t-test as the post hoc test. A P-value of $p < 0.05$ was accepted as the limit of statistical significance.

RESULTS

While a statistical decrease was noted in the activities of antioxidant parameters measured in CDV+ animals compared to healthy animals ($p < 0.05$), a significant increase was found in the level of lipid peroxidation. ($p < 0.05$).

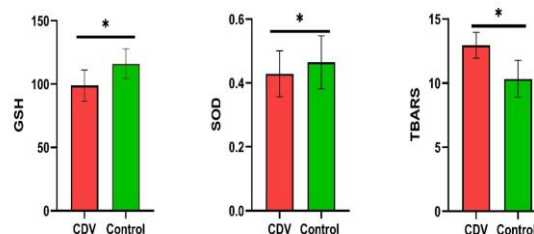


Figure 1: The changes in GSH, SOD and TBARS levels in CDV+ and control dogs. Values are expressed as mean ± SEM. The '*' symbol in the columns shows a statistical difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. (CDV+; Canine Distemper Virus Positive Group)

DISCUSSION AND CONCLUSION

Oxidative stress is defined as an imbalance in the body's generation of reactive oxygen species (ROS), which impairs the body's capacity to detoxify reactive

intermediates or repair damage to organs and cellular systems caused by ROS. (Finaud et al. 2006). However, since oxidative stress affects various systems, including redox signalling pathways, a more accurate description of oxidative stress is "disruption/dysregulation of signalling and redox control" (Jones 2006). Intracellular redox balance is closely related to antioxidant defence systems. When the redox balance is disturbed, reactive species can cause extensive damage to cell membrane lipids and proteins, DNA and cellular organelles (Burton and Jauniaux 2011). It has been determined that oxidative stress is formed, and antioxidant capacity is decreased due to various viral infections. (Paracha et al. 2013; Avci et al. 2014; Değirmençay et al. 2021). The relationship between oxidative stress and antioxidant capacity in veterinary medicine in canine parvoviral enteritis (Panda et al. 2009), acute enteropathies (Candellone et al. 2022), canine monocytic ehrlichiosis (Pugliese et al. 2022), atopic dermatitis (Kapun et al. 2012) and malignant mammary neoplasms. This study aimed to reveal the relationship between CDV, oxidative stress, and antioxidant defence system mechanisms.

ROS accumulation is linked to the pathogenesis of canine distemper (Vandevelde and Zurbriggen 2005). Furthermore, Karadeniz et al. (2008) found that in dogs, the activation of oxidative stress indicators increased while the content of antioxidant molecules dropped. (Karadeniz et al. 2008). Current study results show that serum samples of dogs naturally infected with CDV have increased lipid peroxidation activity ($p < 0.05$) and decreased antioxidant defence system enzyme levels compared to healthy dogs ($p < 0.05$) (Figure 1). Previous studies indicate that CD infection causes oxidative stress and consequent lipid peroxidation, and by-products cause damage to various tissues (Değirmençay et al. 2021; Viscone et al. 2022). Viruses are thought to influence cellular redox balance by increasing the activity of oxidants like MDA and inhibiting the synthesis of antioxidant enzymes like SOD, CAT, and GSH (Camini et al. 2017). OS and lipid peroxidation products may interfere with viral reproduction by causing oxidative damage to host tissues and viral components (Schwarz 1996; Peterhans 1997; Beck 2000; Camini et al. 2017). Oxidative damage to infected and neighbouring cells may potentially limit viral propagation (Camini et al. 2017). However, the extent to which oxidative damage benefits the host by limiting viral replication is unknown for most viral infections (Valyi-Nagy and Dermody 2005). Moreover, it has been stated that at the start of the infection, ROS fights the disease, and the host views this as a protective mechanism that can lead the cell to the apoptotic pathway (Maher and Schubert 2000; Camini et al. 2017). It's claimed that as viral replication progresses, an imbalance in cellular redox homeostasis occurs, resulting in the formation of more ROS (Reshi et al. 2014). As a result, oxidative stress caused by viral infections is thought to modulate adhesion, metabolism, cell turnover, and death (Ha et al. 2010; Choi and Ou 2006; Camini et al. 2017). Based on the research thus far, it is assumed that oxidative stress is associated with various aspects of the pathogenesis of various viral etiological agents (Camini et al. 2017).

As a result, this study, which we found that CDV increases lipid peroxidation activity in serum and decreases antioxidant enzyme level, may be illuminating for further research. We think all aspects of the physiopathological mechanisms related to oxidative stress caused by CDV should be investigated. To better understand how the

host responds to viral infection and CDV acts in the cell, a more detailed examination of signaling pathways, lipid peroxidation mechanisms, inflammatory responses, and antioxidant enzymes may be helpful to elucidate the therapeutic mechanisms that can use to fight and prevent CDV.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors received no financial support for the research, authorship, and publication of this article.

The study protocol was approved by the Ethics Committee (Veterinary Faculty, Selcuk University, Konya, Turkey, Decision No: 2020-124).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: ID, EG

Supervision / Consultancy: ID, DH

Data Collection and / or Processing: EG

Analysis and / or Interpretation: DH, ID

Writing the Article: DH

Critical Review: ID, EG

REFERENCES

- Avci O, Yavru S, Dik I (2014). Determination of lipid peroxidation biomarkers in Vero cell line inoculated with Bovine Ephemeral Fever Virus. *EJVS*, 30 (4), 217-221.
- Beck MA (2000). Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *Am J Clin Nutr*, 71 (6), 1676-1681.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87 (1), 245-313.
- Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*, 127 (1), 1-18.
- Burton GJ, Jauniaux E (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet*, 25 (3), 287-299.
- Camini FC, Da Silva Caetano CC, Almeida LT, De Brito Magalhães CL (2017). Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol*, 162 (4), 907-917.
- Candellone A, Girolami F, Badino P, Jariyawattanachaiikul W, Odore R (2022). Changes in the Oxidative Stress Status of Dogs Affected by Acute Enteropathies. *Vet Sci*, 9 (6), 276.
- Choi J, Ou JH (2006). Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290 (5), G847-851.
- Değirmençay Ş, Çamkerten G, Çamkerten İ, Aktaş MS (2021). An investigation of thiol/disulfide homeostasis and ischemia-modified albumin levels to assess the oxidative stress in dogs with canine distemper. *Vet Arh*, 91 (1), 39-49.
- Dik B, Avci O, Dik I (2019). In Vitro Antiviral and Antioxidant Activities of Silymarin and Panax Ginseng on Vero Cells Infected with Bovine Ephemeral Fever Virus and Blue Tongue Virus. *Acta Pol Pharm*, 76 (2), 291-297.
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative Stress. *Sports Med*, 36 (4), 327-358.
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*, 15 (4), 129-135.
- Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY (2010). Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 16 (48), 6035-6043.
- Halder S, Kar R, Galav V et al. (2016). Cadmium exposure during lactation causes learning and memory-impairment in F1 generation mice: amelioration by quercetin. *Drug Chem Toxicol*, 39 (3), 272-278.
- Hatipoglu D, Keskin E (2022). The effect of curcumin on some cytokines, antioxidants and liver function tests in rats induced by Aflatoxin B1. *Heliyon*, 8 (7), e09890.
- Jones DP (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10), 1865-1879.
- Kapun AP, Salobir J, Levart A, Kotnik T, Svete AN (2012). Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci*, 92 (3), 469-470.
- Karadeniz A, Hanedan B, Cemek M, Borku M (2008). Relationship between canine distemper and oxidative stress in dogs. *Revue Med Vet*, 159 (1), 462-467.

- Lu SC (2009).** Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1), 42-59.
- Mahajan S, Dey S, Kumar A, Panigrahi P (2018).** Nitrosative stress indices in dogs with neurological form of canine distemper. *Iran J Vet Res*, 19 (1), 229-232.
- Maher P, Schubert D (2000).** Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 57 (8), 1287-1305.
- Mariutti LRB (2022).** Lipid Peroxidation (TBARS) in Biological Samples. *Basic Protocols in Foods and Nutrition*, New York, NY: Springer US, 107-113.
- Panda D, Patra RC, Nandi S, Swarup D (2009).** Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res Vet Sci*, 86 (1), 36-42.
- Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M et al. (2013).** Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virology*, 10 (1), 251.
- Peterhans E (1997).** Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J Nutr*, 127 (5), 962s-965s.
- Pugliese M, Biondi V, Merola G, Landi A, Passantino A (2022).** Oxidative Stress Evaluation in Dogs Affected with Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Antioxidants*, 11 (2), 328.
- Radi R (2018).** Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *PNAS*, 115 (23), 5839-5848.
- Reshi ML, Su Y-C, Hong J-R (2014).** RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol*, 2014 (1) 467452-467452.
- Schwarz KB (1996).** Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med*, 21 (5), 641-649.
- Sies H, Jones DP (2020).** Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21 (7), 363-383.
- Stuart JA, Fonseca J, Moradi F et al. (2018).** How Supraphysiological Oxygen Levels in Standard Cell Culture Affect Oxygen-Consuming Reactions. *Oxid Med Cell Longev*, 2018 (1), 8238459.
- Valyi-Nagy T, Dermody TS (2005).** Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol*, 20 (3), 957-967.
- Vandeveldt M, Zurbruggen A (2005).** Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol*, 109 (1), 56-68.
- Viscone ÉA, Oliveira LA, Pereira AaBG et al. (2022).** 4-hydroxy-2-nonenal as a marker of the oxidative stress in brains of dogs with canine distemper. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 59 (1), e188941-e188941.
- Wang P, Gong Q, Hu J, Li X, Zhang X (2021).** Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Prodrugs, Probes, and Theranostic Prodrugs: Applications in the ROS-Related Diseases. *J Med Chem*, 64 (1), 298-325.
- Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S (2018).** Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Bio*, 217 (6), 1915-1928.
- Yazıcı C, Keçeci T, Hatipoğlu D (2021).** The effect of coenzyme Q10 on blood plasma nitric oxide and total antioxidant capacity levels in hypothyroidism-induced rats. *JIVS*, 5 (1), 19-26.



Bovine Ephemeral Fever in Turkey and Its Economic Effect

Cemalettin AYVAZOĞLU^{1,*} Pınar AYVAZOĞLU DEMİR²

¹ Ardahan University, Nihat Delibalta Göle Vocational High School, 75100, Ardahan, Turkey

² Kafkas University, Department of Livestock Economic and Management, Faculty of Veterinary Medicine, 36100, Kars, Turkey

Received: 05.07.2022

Accepted: 24.11.2022

ABSTRACT

Bovine Ephemeral Fever (BEF) is a viral infection that causes a significant decrease in milk and meat production, infertility in cows and bulls, abortion and a significant economic loss due to its rapid spread in the herd. Partial budgeting method was used in the study to measure the economic impact of vaccine use and non-vaccination use. In line with preventive medicine, it has been determined that if animals are vaccinated regularly, there is an average of \$8.10 vaccination cost per animal, but the average treatment cost of an animal that has not been vaccinated during the epidemic is \$20.2. It was determined in the economic analysis that in addition to the treatment costs, the loss of milk for a dairy cow increased to approximately \$85, for a livestock to \$148 with the loss of condition, but the economic loss increased due to high morbidity. In this context, early diagnosis, detection and monitoring of spreading conditions are as extremely important as vaccination in the fight against BEF infection. It can be said that the economic loss will be minimized with the vaccination and preventive medicine practices to be made by rapid intervention to the disease with the early warning system created by the Ministry of Agriculture and Forestry for this purpose in Turkey.

Keywords: Bovine ephemeral fever, Cattle, Turkey.

ÖZ

Türkiye’de Üç Gün Hastalığı ve Ekonomik Boyutu

Bovine Ephemeral Fever (BEF), süt ve et üretiminde önemli bir düşüşe, inek ve boğalarda kısırılığa, düşüklere ve sürüde hızla yayılması nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olan viral bir enfeksiyondür. Çalışmada aşı kullanımının ve aşı kullanmamanın ekonomik etkisini ölçmek için kısmi bütçeleme yöntemi kullanılmıştır. Koruyucu hekimlik doğrultusunda, hayvanlar düzenli aşılanırsa hayvan başına ortalama 8,10 \$ aşı maliyeti olduğu, salgın sırasında aşılanmayan bir hayvanın ortalama tedavi maliyetinin ise 20,2 \$ olduğu belirlendi. Yapılan ekonomik analizde tedavi maliyetlerine ek olarak kondisyon kaybı ile birlikte süt ineği için süt kaybının yaklaşık 85\$, besi hayvanı için 148\$ olduğu, ancak yüksek morbidite nedeniyle ekonomik kaybın arttığı belirlendi. Bu bağlamda BEF enfeksiyonu ile mücadelede aşılama kadar erken teşhis, yayılma koşullarının tespiti ve takibi de son derece önemlidir. Türkiye’de Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından bu amaçla oluşturulan erken uyarı sistemi ile hastalığa hızlı müdahale edilerek yapılacak aşılama ve koruyucu hekimlik uygulamaları ile ekonomik kaybın en aza indirileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Sığır üç gün hastalığı, Türkiye.

INTRODUCTION

Bovine Ephemeral Fever (BEF), which is an economically important viral disease, was first described in 1906 in South Africa (Öztürk 2012; Pyasi et al. 2021). This is locally referred to as three-day disease since infected animals usually recover after three days (Kirkland 2002; Walker 2009). The causative agent of the disease is Bovine Fever Ephemerosvirus (BEFV), which is in the Ephemerosvirus genus in the Rhabdoviridae family (Nandi and Negi 1999). BEFV was isolated from bovine blood in the 1960s and from mosquitoes in the 1970s (Walker and Klement 2015). BEF, apart from the Culicine and Anopheline mosquitoes, especially the stinging flies of the

genus *Anopheles bancroftii* and *Culicoides* are considered as potential biological vectors of the disease, and the disease can also occur with the bites of these flies or the injection of the virus (Alkan et al. 2017). Although the disease first appears sporadically, the morbidity rate reaches 100% at the end of the incubation period (Tonbak et al. 2013a; Abdullah et al. 2020; Pyasi et al. 2021). Animals that survive a BEF outbreak become immune for life and are very rarely reinfected (Tonbak et al. 2013b). It is also reported that the morbidity of the disease is higher in female and premature cattle (Liu et al. 2017).

The clinical symptoms of the disease last 1-3 days and usually heal spontaneously at the end of the 3rd day



(Kirkland 2002; Nandi and Negi 1999). Sudden onset of high fever (the disease rises up to 41-42°C in 12-18 hours), nasal discharge, eye discharge, swelling of the eyelids and general disorders are noted in cattle with BEF (Yeruham et al. 2002). Symptoms are more severe on the 2nd and 3rd days of the illness. Myalgia in the muscles, painful swelling in the joints, tremor, coordination disorder, lameness, lying in the lateral position in some animals, loss of swallowing reflex, apathy towards the environment, emphysema and paralysis occur in advanced stages (Abdullah et al. 2020).

Bovine Ephemeral Fever infections cause a significant decrease in milk production in particular, and complications such as mastitis may occur in some animals, milk yield is not restored in cows that survived the disease, and meat production is decreased in livestock animals. The disease also causes infertility in female cattle and bulls, abortion in pregnant cattle, and a significant economic loss due to its rapid spread in the herd (Nandi and Negi 1999; Yeruham et al. 2002)

Bovine Ephemeral Fever has been reported in more than 40 countries, primarily in Africa, Asia, and countries in the Arabian Peninsula (Em et al. 1997). The first findings regarding the presence of BEF infection in Turkey were reported by Girgin et al. (1986), and it occurs at regular intervals (1999, 2003, 2008, 2012, 2020) especially in the South-East regions of Turkey close to the Syria, Iraq and Iran border (Oğuzoğlu et al. 2013; Tonbak et al. 2013a). Tonbak et al. (2013b) reported in their study that cattle in the eastern, southern, western, Black Sea and Marmara region provinces of Turkey were also affected.

The impact of BEF has been more severe in Turkey due to the increase in the number of animals imported from abroad, the increase in the number of productive breeds produced and global climate changes, and has caused significant economic losses in the livestock sector. Although BEF responds to anti-inflammatory and calcium treatment, these drugs can only reduce the symptoms of lameness and stiffness to a certain extent (Öztürk 2012). The only way to protect against this infection is vaccination.

In this study, it was aimed to determine the economic losses by examining the reflection of vaccinated and unvaccinated cattle with BEF on dairy and fattening enterprises.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approve for this study was conducted the permission of Ardahan Provincial Directorate of Agriculture and Forestry dated 18.08.2021 and numbered E-29486769-325.99-2374077.

Ten veterinarians who practiced clinics in Cukurova Region in June 2020 when the disease emerged and agreed to participate in the survey were interviewed in order to determine the economic loss caused by Bovine Ephemeral Fever, and the data obtained as a result of the interview were calculated and presented in tables.

The cost of the disease was calculated in the study according to two different scenarios.

Scenario 1. Estimated cost due to regular vaccination of the enterprise every year was calculated.

Scenario 2. The estimated economic loss that may occur as a result of not vaccinating the livestock enterprise was calculated.

Partial budgeting method was used in the study to measure the economic impact of vaccine use and non-vaccination use. Only the expenses required by the partial change were taken into account in the partial budgeting method, and since the other expense items do not change, they were not taken into account in the total cost calculation. The technical and economic parameters and their values are given in Table 1.

Table 1. Technical and economic parameters.

| Technical Parameters | Mean | Min | Max | Reference |
|---|------|----------|-------|---------------------------|
| Morbidity (%) | 80.0 | 60.0 | 90.0 | Study finding |
| Mortality (%) | 5.0 | 0.0 | 10.0 | Study finding |
| Abort rate (%) | 3.0 | 1.0 | 6.0 | Study finding |
| Rate of reformed (%) | 15.0 | 10.0 | 20.0 | Study finding |
| Loss of condition (%) | 13.0 | 10.0 | 15.0 | Study finding |
| Protection rate of vaccinations (%) | 96.5 | 90 | 100.0 | Study finding |
| Economic Parameters | | Value | | |
| Loss of milk per cow | | 175.9 kg | | Aziz-Boaran et al. (2014) |
| 1-liter raw milk price | | 0.37 \$ | | USK (2021) |
| Price of 1 kg body weight for reformed animal | | 1.97 \$ | | ESK (2021) |

RESULTS

Two doses of vaccine are administered to cattle, calves and calves of all ages, 21 days apart, at least one month before the disease season in order to prevent BEF, which is an economically important viral disease. Vaccination's protection rate of 96,5% determined interviews with the veterinarians (Table 1). It is sold in the market as 2 bottles in 5-dose bottles with a dilution bottle and lyophilized. The market value of the vaccine is \$20.23, and the cost of vaccination against infection (scenario 1) is given per animal and per herd of 50 heads in Table 2.

It is seen when Table 2 is examined that if animals are vaccinated regularly in line with preventive medicine, there is an average of \$8.10 per animal, and an approximate cost of \$430 for a livestock farm with 50 heads.

According to the data obtained as a result of the interviews with the veterinarians, the estimated economic loss per animal and a livestock enterprise with 50 heads in the absence of vaccination is given in Table 3.

It is seen when Table 3 is examined that while the treatment cost of an animal that was not vaccinated during the epidemic was \$20.2 on average, this value increased to \$85 with the loss of milk for a dairy cow, and \$148 for a livestock with loss of condition. It has been calculated in Table 3 that these losses increase with the increase in the number of animals and death rate, and the estimated loss in a 50 head dairy farm has increased to \$5.381 and to \$7.902 in a fattening farm.

It was also stated in the interviews with the veterinarian working in the field that the enterprises made an additional cost of approximately \$ 138.7 to combat insecticides when the disease broke out as an epidemic.

Table 2. Cost of vaccination (\$) (Scenario 1).

| Expense items | Per Animal | 50 titles in a pack |
|------------------------------------|------------|---------------------|
| Vaccination cost (1st application) | 4.05 \$ | 202.31 \$ |
| Vaccination cost (2nd application) | 4.05 \$ | 202.31 \$ |
| Veterinarian vaccination fee | ----- | 23.12 \$ |
| Total vaccination costs | 8.10 \$ | 427.74 \$ |

Table 3. The cost of the disease (\$) if the vaccine is not administered (Scenario 2).

| Cost items (\$) | per Animal | 50 titles in a pack* |
|--|------------|----------------------|
| a. Treatment cost | | |
| - Anti-inflammatory | | |
| - Vitamin B Complex | 20.20 \$ | 808.0 \$ |
| - Vitamin C | (24.28)** | |
| - Antibiotic** | | |
| b. Loss of milk | 65.08 \$ | 2.603.2 \$ |
| c. Body weight loss | 128.05 \$ | 5.124.0 \$ |
| d. Loss due to death*** | 985.00 \$ | 1.970.0 \$ |
| Total loss | | |
| For a dairy cow (a+b)/for a 50 head dairy business (a+b+d) | 85.28 \$ | 5.381.2 \$ |
| For one livestock (a+c)/for 50 heads (a+c+d) | 148.25 \$ | 7.902.0 \$ |

*: Calculated over the morbidity rate (80%),

** : Where necessary (secondary infection),

***: Calculated over the reformed animal value.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Bovine Ephemeral Fever (BEF) is a viral disease that can cause significant losses in high-yielding cattle and buffaloes and is characterized by the disappearance of clinical findings in a short period of 3-4 days (Nandi and Negi 1999). The disease manifests itself at certain intervals in many regions with tropical, subtropical and hot climates such as Asia, Africa, Australia and the Middle East (Nandi and Negi 1999; Walker and Klement 2015). BEF can be seen sporadically or in large endemic waves, but the onset and severity of outbreaks cannot be predicted (Sackett et al. 2006). However, it has been reported in studies that the disease is seen especially in extreme heat and after precipitation after drought (Walker 2009). As a matter of fact, it has been reported that the mean temperature of BEF infection has increased by 50% since the 2000s (He et al. 2016). In this context, the spread of BEF depends on the abundance and mobility of the susceptible cattle population and the formation of suitable conditions (suitable climate, air, humidity, temperature, etc.) for the vector to multiply (Sellers 1980).

The disease has been reported to occur at certain intervals (1999, 2003, 2008, 2012) in Turkey, especially in the South-East regions of the country close to the border with Syria, Iraq and Iran (Tonbak et al. 2013a). It was stated in interviews with veterinarians that BEF affected cattle in Şanlıurfa, Diyarbakır, Adıyaman and Adana provinces from mid-May to early October in the southern part of Turkey in 2020, after a long break. Although climatic conditions are among the primary reasons for the infection to be seen in border provinces of Turkey, it can be said that unregistered animal movements from the border are also effective.

Bovine Ephemeral Fever infection in cattle is expressed in a wide spectrum ranging from indistinct clinical findings to death (Abdullah et al. 2020; Öztürk 2012). BEF infection is an inflammation-based disease and is one of the rare viral diseases in which early treatment applications (nonsteroidal anti-inflammatory application) are beneficial (Abaylı 2018). It may show symptoms resembling milk fever (tachycardia, lying down, stiffness, muscle tremors, paralysis, torticollis, loss of swallowing reflex) during the febrile phase due to a temporary decrease in serum Ca amount (Uren et al. 1987). In this context, calcium preparation should be given. Anti-inflammatory agents as well as vitamin B and C preparations can be given to support the animal's immune system and increase its resistance. Isotonic fluids can be given if the patient has dehydration (Abaylı 2018). It was determined in the study that an average treatment cost of \$20.2 was made, depending on the severity of the disease. Antibacterial drugs are ineffective since the infection is of viral origin, however the cost of treatment per animal increases to \$24.3 if certain antibacterial preparations are used against secondary infections with the approval of the veterinarian. However, it should be noted here that the economic loss in the enterprise increases with the sudden and rapid emergence of clinical findings in animals in the enterprise in a short time due to the high morbidity of the disease. As a matter of fact, it was estimated in the study conducted that 40 animals became ill and a cost of 808\$ could occur to the enterprise when the disease was calculated over 80% morbidity in a 50-headed enterprise.

The economic effects of bovine ephemeral fever can be significant, the virus is more severe in cows with high milk yield, especially during the lactation period or in high-condition beef cattle (St George 1988). For this reason, it may lead to a decrease in milk production in dairy enterprises and loss of condition in fattening enterprises (Aziz-Boaron et al. 2017). The sales value of the livestock decreases depending on the body weight loss and clinical symptoms of the disease in the interviews with veterinarians. In this context, livestock sold at the value of reformed animals negatively affect the profitability of the enterprise. It was determined in this study that the loss in case of infection for a livestock increased to \$148.

The most important effect of the disease on dairy enterprises is the decrease in milk production. It has been reported in studies that milk production has decreased by 45-70%, and this rate could even reach 90%, but it has reached only 85% of its previous yields 2-3 weeks after infection (Davis et al. 1984; Nandi and Negi 1999, Newton and Wheatley 1970). It can be said that abortion cases are also effective in the decrease in milk production. As a matter of fact, the rate of abortion due to infection was found to be 3% (0-6%) in the interviews. Similar to the findings of this study, Uren et al. (1987) reported that infection causes abortion at a rate of 5.1% and it is seen especially in the eighth or ninth months of pregnancy. In

this case, it can be said that it will also cause calf loss in addition to one-year milk production in cows. It has been reported in a recent study that the virus causes an average of 175.9 kg of milk loss (Aziz-Boaron et al. 2017).

Weight loss due to BEF infection was reported as 20% in a study conducted in Australia (Sackett et al. 2006). The average body weight loss in cattle in the region was determined as 13% in interviews with veterinarians and it was calculated in the analysis that an average of \$128 body weight loss in beef cattle.

The average mortality rate in the region was 5%, and the rate of culling due to disease was 15% in interviews with veterinarians. Similar to this finding, it reported a mortality rate of 2.0% and 8.6% in 1990 and 1999, respectively (Yeruham et al. 2002). On the other hand, Tonbak et al. (2013b) and Walker and Klement (2015) reported unlike this finding that mortality rates by disease or culling were 10-20%. It has been reported in the studies conducted that deaths are due to complications such as pneumonia, coma-toxication, paralysis, loss of reflexes, and dehydration (Abaylı 2018). As a matter of the fact, it was reported in interviews with veterinarians that animals generally occur due to respiratory difficulties.

Although the death rate in BEF outbreaks has increased recently, the overall mortality rate is low. The death of valuable breeding animals, decrease in milk quality and yield, abortion, temporary infertility in bulls, loss of condition in beef cattle, treatment costs are the main economic losses caused by BEF (Uren 1987; Walker 2013). As a matter of fact, it was reported in a study conducted in Israel that there was an average loss of \$280 for a lactating cow, and the loss due to the BEF epidemic in the 1970s exceeded \$200 million (Walker 2009). It has been stated that the economic loss in Australia can reach 100-200 million dollars during severe BEF epidemics (Walker 2013).

Bovine Fever Ephemerovirus infection has been reported to result in persistent immunity (Mackerras et al. 1940; Nandi and Negi 1999; Walker and Klement 2015). That's why researchers made an effort to produce a vaccine. To date, 4 types of BEF vaccines have been developed (live-attenuated vaccines, inactivated vaccines, sub-unit G protein-based vaccines and recombinant vaccines), and live-attenuated, inactivated and subunit vaccines are used the most in the field (Walker and Klement 2015). In a 1985 study, it was reported that the protection rate of the vaccine was 99.99% when Quil A (a purified saponin derivative) was added to the attenuated BEF vaccine. A different study reported that an oil emulsion BEF vaccine developed and tested in Taiwan showed 100% protection (Hsieh et al. 2006). In our study, the protection rate of the vaccines used in parallel with the literature was determined as $\geq 96\%$.

In conclusion, early diagnosis, detection and monitoring of spreading conditions are extremely important in the fight against BEF infection, which causes significant economic losses in the dairy and livestock industry as it causes many yield losses and deaths. In this context, studies are carried out to predict the disease with fly traps set up in many regions of the country to combat vectorial diseases by the Ministry of Agriculture and Forestry. In this respect, it can be said that the economic loss will be minimized with the early warning system and the vaccination and preventive medicine practices to be made by rapid intervention to the disease in the coming years.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Ethical approval for this study was obtained from Ardahan Provincial Directorate of Agriculture and Forestry dated 18.08.2021 and numbered E-29486769-325.99-2374077.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: CA, PAD
Supervision / Consultancy: CA, PAD
Data Collection and / or Processing: CA, PAD
Analysis and / or Interpretation: CA, PAD
Writing the Article: CA, PAD
Critical Review: CA, PAD

REFERENCES

- Abaylı H (2018).** Üç Gün Hastalığı Virüsü Türkiye İzolatının Tüm Genom Sekanslanması ve Bu Virusa Karşı DNA Aşısı Geliştirilmesi. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, Türkiye.
- Abdullah SW, Khan MUR, Aslam A et al. (2020).** Detection of Bovine Ephemeral Fever Virus and its Effects on Blood Parameters and Serum Calcium Levels in Cattle Population of District Swabi, Pakistan. *Indian J Anim Res*, 54 (4), 456-461.
- Alkan F, Albayrak H, Timurkan MO, Ozan E, Coskun N (2017).** Assessment of the molecular epidemiology of bovine ephemeral fever in Turkey. *Vet Arhiv*, 87 (6), 665-675.
- Aziz-Boaron O, Gleser D, Yadin H et al. (2014).** The protective effectiveness of an inactivated bovine ephemeral fever virus vaccine. *Vet Microbiol*, 173 (1-2), 1-8.
- Davis SS, Gibson DS, Clark R (1984).** The effect of bovine ephemeral fever on milk production. *Australian Vet J*, 61 (4), 128-130.
- EM AE, Gameel AA, Afaleq, Al, Gundi, OA, Bukhari A (1997).** Bovine ephemeral fever in Saudi Arabia. *Vet Rec*, 140 (24), 630-631.
- Girgin H, Yonguc AD, Akçora A, Aksak E (1986).** Türkiye'de ilk bovine ephemeral fever salgını. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 5 (10), 5-14.
- He CQ, Liu YX, Wang HM et al. (2016).** New genetic mechanism, origin and population dynamic of bovine ephemeral fever virus. *Vet Microbiol*, 182 (1), 50-56.
- Hsieh YC, Wang SY, Lee YF et al. (2006).** DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovine ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever. *J Vet Med Sci*, 68 (6), 543-548.
- Kirkland PD (2002).** Akabane and bovine ephemeral fever virus infections. *Vet Clin Food Anim Practic*, 18 (3), 501-514.
- Liu D, Li K, Zhang L et al. (2017).** Seroprevalence investigation of bovine ephemeral fever in yaks in Tibetan Plateau of China from 2012 to 2015. *Trop Anim Health Prod*, 49 (1), 227-230.
- Mackerras IM, Mackerras MJ, Burnet FM (1940).** Experimental studies of ephemeral fever in Australian cattle. *CSIRO Bull*, 136, 1-116.
- Nandi S, Negi BS (1999).** Bovine ephemeral fever: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 22 (2), 81-91.
- Newton LG, Wheatley CH (1970).** The occurrence and spread of ephemeral fever of cattle in Queensland. *Australian Vet J*, 46 (12), 561-568.
- Oğuzoğlu TC, Ertürk A, Çizmeci SG, Koç BT, Akça Y (2013).** A report on Bovine Ephemeral Fever Virus in Turkey: Antigenic Variations of Different Strains of EFV in the 1985 and 2012 Outbreaks Using Partial Glycoprotein Gene Sequences. *Transbound Emerg Dis*, 62 (5), 66-70.
- Öztürk SA (2012).** Bovine Ephemeral Fever. *AVKAE Derg*, 2 (2), 26-30.
- Pyasi S, Jonniya NA, Sk MF et al. (2021).** Finding potential inhibitors against RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of bovine ephemeral fever virus (BEFV): an in-silico study. *J Biomol Struct Dyn*, 8 (1), 1-19.
- Sackett D, Holmes P, Abbott K et al. (2006).** Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. *MLA Report AHW*, 87.
- Sellers RF (1980).** Weather, host and vector–their interplay in the spread of insect-borne animal virus diseases. *Epidemiol Infect*, 85 (1), 65-102.
- St George TD (1988).** Bovine ephemeral fever: a review. *Trop Anim Health Prod*, 20 (4), 194-202.
- Tonbak S, Berber E, Çabalar M (2013b).** Türkiye'nin bazı bölgelerinde 2008 yılında görülen bovine ephemeral fever virüs enfeksiyonlarının

- polimeraz zincir reaksiyonuyla belirlenmesi. *Firat Uni Med J Health Sci*, 27 (1), 35-37.
- Tonbak S, Berber E, Yoruk MD et al. (2013a).** A Large-Scale Outbreak of Bovine Ephemeral Fever in Turkey, 2012, *J Vet Med Sci*, 75 (11), 1511-1514.
- Uren MF, St George TD, Kirkland PD et al. (1987).** Epidemiology of Bovine Ephemeral Fever in Australia 1981-1985. *Australian J Biol Sci*, 40 (2), 125-136.
- Vanselow BA, Abetz I, Trenfield K (1985).** A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A: a comparative study using adjuvants Quil A, aluminium hydroxide gel and dextran sulphate. *Vet Rec*, 117 (2), 37-43.
- Walker PJ (2009).** Animal Viruses of Agricultural Importance. Mahy BWJ, Regenmortel MHV (Ed). Desk Encyclopedia of Animal and Bacterial Virology (pp. 57-65). Academic Press, San Diego.
- Walker PJ (2013).** Bovine ephemeral fever: cyclic resurgence of a climate-sensitive vector-borne disease. *Microbiol Australia*, 34 (1), 41-42.
- Walker PJ, Klement E (2015).** Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res*, 46 (1), 1-19.
- Yeruham I, Braverman Y, Yadin H et al. (2002).** Epidemiological investigations of outbreaks of bovine ephemeral fever in Israel. *Vet Rec*, 151 (4), 117-121.



Üreme Mevsimindeki Romanov Koyunlarında Senkronizasyon Protokolü ile Birlikte D Vitamini Enjeksiyonunun Bazı Üreme Parametreleri Üzerine Etkisi

Semra KAYA^{1,*} Gökhan KOÇAK²

¹ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 36300, Kars, Turkey

² Iğdir University, Faculty of Applied Sciences, 76000, Iğdir, Turkey

Received: 18.07.2022

Accepted: 19.11.2022

ÖZ

Sunulan çalışmada üreme mevsiminde bulunan Romanov koyunlarında senkronizasyon protokolüne başlandığı gün D vitamini enjeksiyonunun kuzulama performansı ve bazı fertilitate parametreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışma 2-4 yaşlı 40 adet Romanov ırkı koyunda yürütüldü. Senkronizasyon protokolüne başlandığı gün ilk gruptaki koyunlara (n=23) D vitamini enjeksiyonu (1 ml, Provet-D₃[®], Provet, Türkiye) yapılırken, ikinci gruptaki koyunlara (n=17, kontrol grubu) 1 mL serum fizyolojik kas içi olarak enjekte edildi. Kızgınlıkları senkronize etmek amacıyla tüm koyunlara 14 gün süre ile vagina içi sünger (20 mg flugestone asetat, Chronogest[®], Fransa) uygulandı ve çıkarıldıktan hemen sonra 300 IU gebe kısrak serum gonadotropini (eCG; Chrono-Gest/PMSG[®], Almanya) kas içi olarak uygulandı. Her iki grupta östrus (%100), gebelik (%100) ve kuzulama oranı (%100) benzerdi. Çoğul kuzulama oranının D vitamini uygulanan grupta (%91.3) daha yüksek olduğu saptandı. Fekundite ve verimlilik oranı da D vitamini uygulanan grupta daha yüksekti. Sonuç olarak D vitamini uygulamasının senkronizasyon protokolünden elde edilecek yavru veriminin artmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. D vitamini enjeksiyonlarının fertilitate parametreleri üzerindeki etkilerini daha net ortaya koyabilmek için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, Gebelik oranı, Koyun, Östrus senkronizasyonu.

ABSTRACT

Effect of Vitamin D Injection with Synchronization Protocol on Some Reproductive Parameters in Romanov Sheep in Breeding Season

In the present study, it was aimed to investigate the effect of vitamin D injection on lambing performance and some fertility parameters on the day the synchronization protocol was started in Romanov sheep in breeding season. The study was carried out in 40 Romanov sheep aged 2-4 years. The sheep in the first group (n=23) were injected with vitamin D (1 ml, Provet-D₃[®], Provet, Turkey) on the day the synchronization protocol was started, while the sheep in the second group (n=17, control group) were injected intramuscularly with 1 mL of saline. In order to synchronize the estrus, intravaginal sponge (20 mg flugestone acetate, Chronogest[®], France) was applied to all sheep for 14 days and 300 IU pregnant mare serum gonadotropin (eCG; Chrono-Gest/PMSG[®], Germany) was injected intramuscularly immediately after removal. Estrus (100%), pregnancy (100%) and lambing rates (100%) were similar in both groups. It was determined that the rate of multiple lambing was higher in the vitamin D administered group. Fecundity and productivity rates were also higher (91.3%) in the vitamin D administered group. As a result, it is thought that the application of vitamin D may contribute to the increase in the yield of offspring to be obtained from the synchronization protocol. It has been concluded that more comprehensive studies are needed to more clearly reveal the effects of vitamin D injections on fertility parameters.

Keywords: D vitamin, Pregnancy rate, Sheep, Estrus synchronization.

GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde verimliliğin sağlanması için en önemli unsur üremenin optimal düzeyde devam etmesidir. Bu amaçla koyun yetiştiriciliğinde hormonal uygulamalar ve beslenme stratejisinde değişiklikler yapılarak verim artırılmaya çalışılmaktadır. Mevsim içi dönemde

östrusların senkronizasyonu amacıyla en fazla kullanılan hormon PGF_{2α} (luteal fazın kısaltılması) veya progesteron (luteal fazın yapay olarak uzatılması)'dur (Jainudeen ve ark. 2000; Kusina ve ark. 2000; İbiş ve Ağaoğlu 2016; Kaçar ve ark. 2016; Soydan ve Şen 2018).

D vitamini steroid hormon ailesine ait yağda çözünen bir



vitamindir. Üreme üzerindeki etkilerini D vitamini reseptörü aracılığıyla gerçekleştirmektedir. D vitamini reseptörleri ovaryum, uterus, endometriyum ve plasenta gibi pek çok dokuya yayılmıştır (Shahrokhi ve ark. 2016; Yang ve Ma 2021). D vitamininin nöroendokrin sistem ve ovaryum fizyolojisinin düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca embriyonun canlılığı, implantasyonun korunması ve doğurganlık üzerine olumlu etkisinin olduğu açıklanmıştır (Yang ve Ma 2021). Ayrıca D vitamininin implantasyonu kolaylaştırmada rol oynayabileceği bildirilmektedir. Aktif D vitamini olan kalsitriol, T hücre fonksiyonunu ve endometrial hücrelerden sitokin üretimini azaltarak implantasyon başarısında etkili olduğu bildirilmektedir (Turan 2018). D vitamini, optimal fetal büyümeyi desteklemek için plasentanın büyümesini ve aminoasit, yağ ve glikoz gibi besinlerin taşınmasını değiştirmektedir. Plasentada besin taşınmasından sorumlu genlerdeki varyasyonun D vitamini reseptöründeki değişiklikten etkilenebileceği bildirilmektedir. Bu durum D vitamininin fütüste potansiyel rolü hakkında bilgi sunmaktadır (Cleal ve ark. 2017).

Romanov koyununun anavatanı Rusya'dır (Ricordeau ve ark. 1990; Kuru ve ark. 2022). Yüksek döl verimine ve çevreye iyi uyum yeteneğine sahiptir. Olgunluk yaşına erken ulaşmaktadır, uzun bir çiftleşme sezonuna ve kısa bir anöstrus periyoduna sahiptir (Ricordeau ve ark. 1990; Şen ve Uğurlu 2021; Kuru ve ark. 2022). Yüksek ovulasyon ve çoklu doğum oranına sahiptir (Kuru ve ark. 2022).

Sunulan çalışmada mevsim içi dönemdeki Romanov koyunlarında senkronizasyon protokolüne başlandığı gün D vitamini enjeksiyonunun bazı üreme parametreleri ile yavru ağırlıkları üzerine etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 25.10.2021 tarihinde 158 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Araştırma 2021 yılı Ekim ayında Kars ilindeki özel bir işletmede yetiştirilen 2-4 yaşlı, 48-50 kg canlı ağırlığında, klinik olarak sağlıklı ve laktasyonda olmayan 40 adet Romanov ırkı koyunda yürütüldü. Çalışma da fertil ve sağlıklı olduğu bilinen 6 adet koç kullanıldı. Hayvanlara günlük 800 gr arpa verildi. Kuru yonca ve su ad libitum olarak verildi. Doğuma yakın ortalama 10 gün vitamin, mineral ve maya karışımı içeren yem katkısı (Euromix, Royal, Türkiye) verildi.

Çalışma Yöntemi

Çalışmaya dahil edilen koyunlar rastgele iki gruba ayrıldı. Senkronizasyon protokolüne başlandığı gün (Şekil 1) ilk gruptaki koyunlara (n=23) 1 ml D₃ vitamini enjeksiyonu (1000000 IU, Provet-D₃, Provet, Türkiye) yapıldı. İkinci gruptaki koyunlar (n=17) ise kontrol grubu olarak değerlendirildi ve uygulama gününü 1 mL serum fizyolojik kas içi olarak enjekte edildi. Tüm koyunlara 14 gün süre ile vücutta kalacak şekilde intravaginal sünger (20 mg flugeston acetat, Chronogest®, Fransa) yerleştirildi. Süngerler çıkarıldıktan hemen sonra tüm koyunlara 300 IU eCG (Chrono-gest/PMSG, Almanya) enjeksiyonu yapıldı ve 16 saat sonra koçlar sürüye katıldı. Koç katımından sonra günde 2 defa (12 saat arayla) 30 dakika süresince östruslar takip edildi. Östrusların tarih ve saatleri kaydedildi. Çiftleşmeyi takip eden 30. gün ultrasonografi cihazı (Hasvet 838 model, Hasvet, Türkiye) ile gebelik

muayeneleri yapıldı. Her koyun için kuzulama tarihi ve yavruların cinsiyeti kaydedildi.

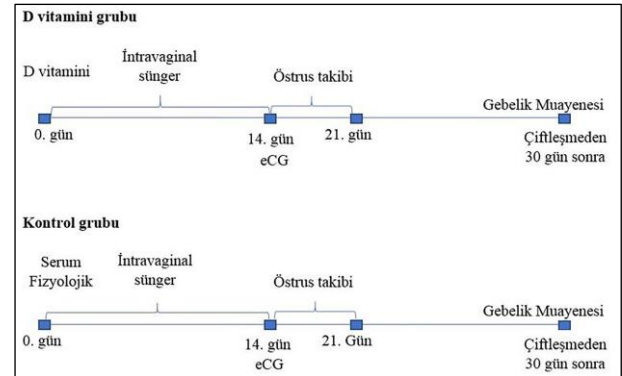
Reprodüktif parametreler, aşağıdaki formüller kullanılarak kaydedilen bulgulardan hesaplanarak elde edildi. Bu parametreler;

- *Östrus oranı* [*Östrus gösteren koyun sayısı/ Senkronize edilen koyun sayısı*] $\times 100$,
- *Gebelik oranı* [*Gebe koyun sayısı/Östrüsleri belirlenip aşım yaptırılan koyun sayısı*] $\times 100$,
- *Fertilite* [*Kuzulayan koyun sayısı/Çiftleşen koyun sayısı*] $\times 100$,
- *Doğum oranı* [*Doğuran koyun sayısı/Gebe koyun sayısı*] $\times 100$,
- *Koç altı koyun başına kuzu sayısı (fekundite)* [*Doğan kuzu sayısı/Çiftleşen koyun sayısı*],
- *Doğuran koyun başına kuzu sayısı (litter size)* [*Doğan kuzu sayısı/Doğuran koyun sayısı*],
- *Tek yavru doğumu* [*Bir kuzu ile kuzulayan koyun sayısı/Doğum yapan koyun sayısı*] $\times 100$,
- *Çoklu kuzulama* [*İki veya daha fazla kuzu ile doğum yapan koyun sayısı/Doğum yapan koyun sayısı*] $\times 100$

şeklindeydi.

İstatistik Analiz

Verilerin analizleri SPSS® (SPSS 18, IL, USA) programında yapıldı. Gruplar arasında yüzde oranları ki-kare yöntemiyle karşılaştırıldı. Yavru ağırlıkları Student T testi ile analiz edildi. p<0.05 önemli kabul edildi.



Şekil 1. Gruplarda deney dizaynı.

Figure 1. Experiment design in groups.

BULGULAR

Intravaginal sünger uygulanan koyunların hiçbirinde süngerin düşmediği tespit edildi. Romanov koyunlarında mevsim içi dönemde yapılan senkronizasyon protokolüne ait reprodüktif parametre sonuçları Tablo 1'de sunuldu. Koç katımı ile östrus arası sürenin 6-30 saat arasında değiştiği ve östrus oranının her iki grupta %100 olduğu belirlendi. Senkronizasyonu takiben tüm koyunlarda gebelik şekillendi. Hiçbir koyunda embriyonik ölüme rastlanmadı. Çoğul doğum oranının D vitamini uygulanan grupta (%91.3) daha yüksek olduğu saptandı (p<0.001). Doğuran koyun başına kuzu sayısı oranının D vitamini uygulanan grupta (2.4±0.2) kontrol grubundan (2.1±0.2) yüksek olduğu belirlendi. D vitamini uygulanan grupta 2'si tekli, 21'i çoklu kuzulama ile toplam 55 kuzu elde edilirken, kontrol grubunda ise 5'i tekli, 12'si çoklu yavru doğumu ile toplam 35 kuzu elde edildi. D vitamini uygulanan grupta doğan yavruların 33'ü erkek, 22'si dişi

iken, kontrol grubunda 13'ü erkek, 22'sinin dişi olduğu belirlendi. Kontrol grubundaki 4 kuzunun doğumu takip eden saatlerde öldüğü belirlendi.

Doğan kuzuların ortalama yavru ağırlıkları Tablo 2'de sunuldu. Ortalama yavru ağırlıklarının D vitamini uygulanan grupta 2.67 ± 0.08 , kontrol grubunda ise 2.58 ± 0.09 kg olduğu belirlendi. Yavru ağırlıkları bakımından gruplar arasında fark olmadığı saptandı ($p=0.46$).

Tablo 1. Gruplardaki fertilitite parametreleri.

Table 1. Fertility parameters in the groups.

| Parametreler | D vitamini | Kontrol |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Tedavi edilen koyun sayısı (n) | 23 | 17 |
| Östrus cevap oranı (%) | 23/23 (100) | 17/17 (100) |
| Gebelik oranı (%) | 23/23 (100) | 17/17 (100) |
| Kuzulama oranı (%) | 23/23 (100) | 17/17 (100) |
| Tek yavru doğumu (%) | 2/23 (8.7) | 5/17 (29.1) |
| Çoklu kuzulama (%) | 21/23 (91.3) ^a | 12/17 (70.59) ^b |
| İkiz (%) | 11/23 (47.83) | 7/17 (41.18) |
| Üçüz (%) | 9/23 (39.13) | 4/17 (23.53) |
| Dördüz (%) | 1/23 (4.35) | 1/17 (5.88) |
| Koç altı koyun başına kuzu sayısı | 55/23 (2.39) | 35/17 (2.06) |
| Doğuran koyun başına kuzu sayısı | 2.4 ± 0.2 | 2.1 ± 0.2 |
| Ölüm oranı (kuzu) | 0 | 4 |

n=koyun sayısı, a, b: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı gösterir ($p<0.001$).

Tablo 2. Gruplardaki kuzu doğum ağırlıklarının karşılaştırılması.

Table 2. The comparison of lamb birth weights in the groups.

| Gruplar | Ortalama yavru ağırlığı (kg) | Dişi kuzu ağırlığı (kg) | Erkek kuzu ağırlığı (kg) |
|------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| D vitamini | 2.67 ± 0.08 | 2.51 ± 0.15 | 2.77 ± 0.09 |
| Kontrol | 2.58 ± 0.09 | 2.63 ± 0.12 | 2.49 ± 0.14 |

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmada üreme mevsiminde kızgınlıkları toplulaştırmak amacıyla yapılan senkronizasyon protokollerinden elde edilen yavru veriminde artış sağlamak amacıyla bu protokollere ek olarak D vitamini uygulaması yapılmıştır. Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olduğundan dolayı mevsim başında östrus gösterip gebe kalan koyun ile mevsim sonunda östrus gösterip gebe kalan koyun arasında oldukça uzun bir zaman farkı söz konusu olabilmektedir. Bu durumda doğumların farklı zamanlarda gerçekleşmesine, dolayısıyla sürüde tek tip bakım ve besleme programının yapılamamasına, barınakta doğumlara uygun bölmelerin ayarlanamamasına ve meraların etkin bir şekilde kullanılamamasına neden olmaktadır. Tüm bu gerekçeler daha fazla işgücüne ve ekonomik kayba neden olmaktadır (Alkan ve ark. 2012). Bu sebeple aşım sezonu çeşitli senkronizasyon protokolleri yapılmaktadır. Uçar ve ark. (2002) tarafından progesteron+eCG uygulamaları ile senkronize edilen koyunlarda sünger çıkarıldıktan sonraki 24-56 saatler arasında östruslar gözlemlenmiş ve östrus

oranını %100 olarak belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada 14 günlük intravaginal progesteron uygulanan koyunlarda fertilitite oranının %75 olduğu saptanmıştır. 12 gün progesteron+eCG enjeksiyonu yapılan Romanov+Pelibuey koyunlarında östrus oranı %100 elde edilirken, fertilitite oranının %65 olduğu belirlenmiştir. Koyun başına doğan kuzu sayısı 2.0 ± 0.4 , fekundite ise %140 olarak belirlenmiştir. Tekil gebelik oranı %7.7, çoğul gebelik oranı ise %92.3 olarak belirlenmiştir (Macías-Cruz ve ark. 2013). Sunulan çalışma da ise bu çalışmalarla benzer şekilde östrus oranları %100 olduğu belirlenirken, fertilititenin daha yüksek olduğu (%100) saptandı. Hem kontrol hem de D vitamini uygulanan grupta kuzulayan koyun başına yavru sayısının ve fekunditenin daha yüksek olduğu görüldü. Bu değerler yönünden oluşan bu pozitif farkın kullanılan eCG dozundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

D vitamini dişilerin fertilitesinde önemli rol oynamaktadır (Kwiecinski ve ark. 1989). Bu etkisini cinsiyet hormonlarının steroidogenezisini düzenleyerek oluşturmaktadır (Muscogiuri ve ark. 2017). İnsanlarda yapılan çalışmada ovaryumdaki D vitamini reseptörlerine granuloza ve kumulus ooforus hücrelerinde rastlanmıştır. Bilindiği üzere dişilerde cinsiyet steroid hormonlarının üretimi en fazla granuloza hücrelerinde olmaktadır. Bu durum D vitamini reseptörü aracılığı ile D vitamininin steroidogeneziste rol alan anahtar enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini düzenleyerek üreme üzerine etki edebileceğini göstermektedir. D vitamininin hem ovaryumdan hem de plasentadan progesteron ve östradiol üretimini artırdığı bildirilmektedir (Muscogiuri ve ark. 2017). Ayrıca D vitamini feto-plasental birimlerden kalsiyum transportunda rol oynamaktadır (Cleal ve ark. 2017, Muscogiuri ve ark. 2017). Kalsiyumun subklinik yetersizliğinin ruminantlarda üreme kayıplarında önemli olduğu bildirilmektedir (Gabryszuk ve Klewiec 1996). D vitamini bağırsaklardan ve böbreklerden kalsiyumun geri emiliminde ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunda rol oynamaktadır (Gabryszuk ve Klewiec 1996). Kalsiyum enjeksiyonu yapılan 3 yaşlı koyunlarda fertilitenin önemli oranda arttığı saptanmıştır. Benzer şekilde kuzulayan koyun başına yavru veriminin de sayısal olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Gabryszuk ve Klewiec 1996). D vitamini yetersizliği bulunan dişi ratlarda doğurganlığın ve yavru veriminin azaldığı belirlenmiştir. D vitamini yetersizliğinde normal ve sağlıklı yavru dünyaya gelme oranının %73 oranında azaldığı saptanmıştır (Kwiecinski ve ark. 1989). Pırlak koyunlarında yapılan bir çalışma da çiftleşme günü A, D₃ ve E vitamini enjeksiyonunun bazı reproduktif parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada östrus oranı %92.5, kontrol grubunda ise %90 belirlenirken, gebelik oranları sırasıyla %87.5 ile %75 olduğu saptanmıştır (Birdane ve ark. 2020). Koyunlarda progesteron temelli senkronizasyon protokollerinin uygulandığı bir diğer çalışmada CIDR uygulandığı veya çıkarıldığı gün A ve E vitamini+Se enjeksiyonu yapılan grupta gebelik ve kuzulama oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Koyuncu ve ark. 2019). Yine E vitamini ve Selenyum enjeksiyonu yapılan bir çalışmada koyunlarda fekunditenin (148.1) kontrol grubundan (115.4) önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir (Koyuncu ve Yerlikaya 2007). Gebelik döneminde D vitamini uygulanan hayvanlarda hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu mortalite oranının azaldığı bildirilmektedir. Gebeliğin son döneminde D vitamini enjeksiyonunun koyunlarda üreme performansını ve kuzuların sağ kalımını iyileştirdiği açıklanmıştır (Kobeisy

ve ark. 2021). Bu çalışmaların yanı sıra, Zhou ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, D vitamini ile koyun başına doğan yavru sayısı arasında bir ilişki belirlememişlerdir. Yukarıdaki çalışmalar ile karşılaştırıldığında sunulan çalışmada senkronizasyona başlandığı gün D vitamini enjeksiyonunun çoğul gebelik oranını artırdığı ve fekundite oranının daha yüksek olduğu belirlendi. Bu artışın D vitamininin folikülogenezis üzerine pozitif etki yapmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Yang ve Ma, 2021).

Zhou ve ark. (2019), D vitamini ile doğan yavru ağırlıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise ortalama yavru ağırlıkları bakımından gruplar arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak senkronizasyon protokolüne başlandığı gün D vitamini enjeksiyonunun çoğul gebelik oranını ve fekundite oranını artırarak sürüde verimliliğin artmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Fertilite ile D vitamini uygulaması arasındaki ilişkinin daha net ortaya konulabilmesi için yemlerden alınan vitamin düzeyi ve kan D vitamini seviyesinin belirlenerek daha net sonuçların ortaya konulması gerekmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 25.10.2021 tarihinde 158 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: SK, GK
Denetleme/Danışmanlık: SK
Veri Toplama ve/veya İşleme: SK, GK
Analiz ve/veya Yorum: SK, GK
Makalenin Yazımı: SK, GK
Eleştirel İnceleme: SK, GK

KAYNAKLAR

- Alkan S, Kaşıkçı G, Cirit Ü ve ark. (2012).** Tahirova Koyunlarında Modifiye Ovsynch Protokolünün Senkronizasyon ve Fertilite Oranlarına Etkisi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 38 (1), 37-42.
- Birdane MK, Avdatek F (2020).** Effect of Vitamin A, D₃, E Treatment on Fertility in the Pırlak Sheep. *Kocatepe Vet J*, 13 (2), 179-184.
- Cleal JK, Hargreaves MR, Poore KR (2017).** Reduced fetal vitamin D status by maternal undernutrition during discrete gestational windows in sheep. *J Dev Orig Health Dis*, 8 (3), 370-381.

- Gabryszak M, Klewec J (1996).** Effect of injecting 2- and 3-year-old ewes with calcium and magnesium on reproduction and rearing of lambs. *Small Rum Res*, 23 (2-3), 151-155.
- İbiş M, Ağaoglu AR (2016).** Koyun ve Keçilerde Üremenin Senkronizasyonu. *MAE Vet Fak Derg*, 1 (2), 47-53.
- Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE (2000).** Sheep and Goats. Hafez ESE, Hafez B (Ed). *Reproduction and Farm Animals* (pp. 172-181). A Wolters Kluwer Company, Philadelphia.
- Kaçar C, Kaya, S, Kuru M (2016).** Koyun ve Keçilerde Üremenin Denetlenmesinde Güncel Yöntemler. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci-Special Topics*, 2 (1), 29-37.
- Kobeisy MA, Badry G, Ata A, Salem A (2021).** Effect of vitamin D injection on reproductive performance of Saidi ewes. *Egyptian J Nutrition and Feeds*, 24 (2), 17-23.
- Koyuncu M, Yerlikaya H (2007).** Effect of selenium-vitamin E injections of ewes on reproduction and growth of their lambs. *S Afr J Anim Sci*, 37 (3), 233-236.
- Koyuncu M, Altınçekiç ŞÖ, Nageye Fİ (2019).** Anöstrus Dönemindeki Koyunlarda CIDR, Vitamin A, E+Selenium Kullanımının Döl Verimine Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 22 (Ek Sayı 1), 179-187.
- Kuru M, Kuru BB, Kaçar C et al. (2022).** Effect of oestrus synchronization with different lengths of progesterone-impregnated sponges and equine chorionic gonadotropin on reproductive efficiency in Romanov ewes during the non-breeding season. *Acta Vet Brno*, 91, 243-250.
- Kusina NT, Tarwirei F, Hamudikuwanda H, Agumba G, Mukwena J (2000).** A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF₂alpha, and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology*, 53 (8), 1567-1580.
- Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF (1989).** Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*, 119 (5), 741-744.
- Macias-Cruz U, Ponce-Covarrubias JL, Álvarez-Valenzuela FD et al. (2013).** Reproductive efficiency of Pelibuey and Romanov × Pelibuey ewes synchronized with synthetic progesterone and low doses of PMSG under a hot environment. *Czech J Anim Sci*, 58 (12), 546-553.
- Muscogiuri G, Altieri B, Angelis C et al. (2017).** Shedding new light on female fertility: The role of vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord*, 18 (3), 273-283.
- Ricordeau G, Thimonier J, Poivey JP et al. (1990).** I.N.R.A. research on the Romanov sheep breed in France: A review. *Livest Prod Sci*, 24, 305-332.
- Shahrokhi SZ, Ghaffari F, Kazerouni F (2016).** Role of Vitamin D in Female Reproduction. *Clin Chim Acta*, 455, 33-38.
- Soydan E, Şen U (2018).** Karayaka Koyunlarında Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Uygulamasının (GnRH) Ovaryum Aktivitesi Üzerine Etkisi. *TURSTEP*, 6 (4), 508-512.
- Şen M, Uğurlu M (2021).** Romanov Koyun Irkında Dölverimi Özellikleri, Yaşama Gücü, Büyüme Performansı ve Bazı Vücut Ölçüleri. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 16 (2), 155-163.
- Turan ÖD (2018).** Vitamin D Level and Infertility. *Meandros Med Dental J*, 19 (2), 106-110.
- Uçar M, Gündoğan M, Özdemir M ve ark. (2002).** Değişik Irk Koyunlarda Progesteron+eCG ile Östrusların Senkronize Edilmesi ve Hayvanlarda Kolesterol ile Progesteron Seviyelerinin Araştırılması. *Vet Bilim Derg*, 18 (3), 79-85.
- Yang P, Ma Y (2021).** Recent advances of vitamin D in immune, reproduction, performance for pig: a review. *Anim Health Res Rev*, 22 (1), 85-95.
- Zhou P, McEvoy TG, Gill AC et al. (2019).** Investigation of relationship between vitamin D status and reproductive fitness in Scottish hill sheep. *Scientific Reports*, 9 (1), 1162.



Kedilerde Medetomidin/Ketamin ve Ksilazin/Ketamin Anestezisinin Kardiyovasküler Fonksiyonlar Üzerindeki Etkilerinin ve Atipamezol ile Geri Dönüşümünün Karşılaştırılması

Murat KİBAR^{1,*} Aidai ZHUNUSHOVA² Zeynep ÖZTÜRK³

¹ Artvin Çoruh University, Artvin Vocational School, Hunting and Wild Life Medicine Programme, 08100, Artvin, Turkey

² Kyrgyzstan Turkish Manas University, Faculty of Veterinary Medicine, Small Animal Clinic, 720038, Bishkek, Kyrgyzstan

³ Artvin Çoruh University, Hopa Faculty of Economics and Administrative Sciences, Department of Business, 08600, Artvin, Turkey

Received: 03.08.2022

Accepted: 18.11.2022

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, medetomidin/ketamin (MED-KET) ve ksilazin/ketamin (KSZ-KET) anestezisindeki kedilerde kısa süreli kardiyovasküler etkilerini ve atipamezol ile bu etkilerinin geri dönüşümünü ekokardiyografi tekniği ile araştırmaktır. Erişkin 20 diş kedi (ağırlığı 2.2-3.6 kg ve yaşı 0.5-5.5 arasında) ovariohisterektomi için getirildi. Elektrokardiyogram, invaziv olmayan kan basıncı ölçümü, solunum sayısı, kalp atımı ve periferik oksijen düzeyi anestezisi süresince izlendi. Her iki grup anestezisi induksiyonundan sonra sol ventrikül çapı (%LVD) ve sol ventrikül fırlatma fraksiyonu (EF) azalması (T0'a karşı T1, $p < 0.05$) göstermiştir. Bununla birlikte azalma ve başlangıç değerlerine dönüş gruplar arasında istatistik olarak farklıydı. Sonuç olarak, MED-KET ve KSZ-KET ile anestezisi sonrası ekokardiyografik değerlerin anlamlı düzeyde etkilendiği ve atipamezolün, ovariohisterektomi gibi abdominal cerrahiler sonrasında kedilerde hızlı ve güvenli bir şekilde başlangıç değerlerine dönüş için faydalı olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antagonist, Atipamezol, Ekokardiyografi, Kalp.

ABSTRACT

Comparison of the Effects of Medetomidine/Ketamine and Xylazine/Ketamine Anesthesia and Its Reversal by Atipamezole on Cardiovascular Functions in Cats

The aim of this study was to investigate the short-term cardiovascular effects of medetomidine/ketamine (MED-KET) and xylazine/ketamine (XYZ-KET) anesthesia regimes and its reversal (atipamezole) in cats through using echocardiography. Twenty sexually intact female cats (weighing between 2.2 and 3.6 kg, and between 0.5 and 5.5 years of age) referred for ovariohysterectomy procedure. Electrocardiogram, non-invasive blood pressure, respiratory rate, heart rate and pulse oximetry were monitored throughout the anesthesia. Both groups showed declines in left ventricular diameter (LVD%) and left ventricular ejection fraction (EF) after anesthesia induction (T0 vs. T1, all, $p < 0.05$); nevertheless, the reduction and starting pattern of LVD% and left ventricular EF presented important intergroup distinction. In conclusion, echocardiographic values effected significantly after anesthesia with MED-KET and XYZ-KET; and atipamezole can be useful for return to baseline values quickly and safely in cats after abdominal surgery such as ovariohysterectomy.

Keywords: Antagonized, Atipamezole, Echocardiography, Heart.

GİRİŞ

Hem deneysel modeller hem de tedavi işlemleri için hayvanlar tıbbi müdahaleler sırasında anestezide sıklıkla ihtiyaç duyulur. Kardiyovasküler sistemin anesteziklere tepkisi, doza, deneysel modele ve ajan seçimine bağlı olarak çok farklı olabilir (Wessler ve ark. 2011; Vilar ve ark. 2018; Simonini ve ark. 2022). En çok kullanılan idame ve induksiyon anestezisi prosedürlerinin parasempatik ve sempatik sinir sistemlerini, miyokardın kasılma özelliklerini ve damar tonusunu etkilediği bilinir (Wessler ve ark. 2011; Lin ve ark. 2021; O'Gara ve ark. 2022).

Medetomidin, güçlü kas gevşetici özelliklere sahiptir. Aynı zamanda sakinleştirici bir analjeziktir. Medetomidin genellikle hayvanları radyografi veya oral muayene gibi cerrahi olmayan prosedürler için hareketsiz hale getirmek için genel anestezisi öncesi premedikasyon amacıyla kullanılır. Son derece spesifik bir α_2 adrenerejik agonistidir (Kılıç ve ark. 2004). Medetomidin başlangıçta sedasyon ve primer hipertansiyona neden olur, daha sonra artan damar içi uygulama ile bradikardiye yol açar ve kan basıncını normale veya hafif altına düşürür (Salla ve ark. 2017;



Hollis ve ark. 2020).

Xylazine, α_2 adrenerjik reseptör agonist özelliklerine sahip sakinleştirici bir ajandır. 1962'de Almanya'da antihipertansif olarak kullanılmak üzere sentezlendi. Ancak sonrasında hayvanlarda güçlü yatıştırıcı etkileri olduğu tespit edildi (Kılıç 2004; Anandmay ve ark. 2016). İlaç, köpeklerde intravenöz uygulamadan sonra aort akışında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, kalp hızında azalma, periferik dirençte artış ve kan basıncında başlangıçta artış ve ardından bir düşüş gerçekleştirir (Anandmay ve ark. 2016; Hopster ve ark. 2017). Köpeklere ksilazin enjeksiyonunun kusmaya neden olabileceği, göz içi basıncının belirgin şekilde yükseldiği fark edilmiştir (Anandmay ve ark. 2016).

Bir fensiklidin ve sikloheksam türevi olan ketamin sıklıkla anestezi başlatmakta kullanılan N-metil-D-aspartat antagonistidir. Limbik, retiküler aktive edici ve talamokortikal sistemler üzerinde etkilidir (Erhard ve ark. 2001; Kılıç ve ark. 2001; Lee and Jones 2018). Ketaminin kullanımı kısıtlandırılan artan kalp debisi, damar direnci ve kalp hızı gibi değişik kardiyovasküler etkileri mevcuttur.

Her biri atipamezol ile antagonize olabilen medetomidin/ketamin (MED-KET) ve ksilazin/ketamin (KSZ-KET) kombinasyonu ile anestezi, hayvanlar için yararlı bir anestezi tekniği olarak tanımlanmıştır (Astner 1998; Henke ve ark. 2005; Baumgartner 2010). Bu ilaç kombinasyonlarının bariz faydaları, tüm bileşenler için atipamezolün rekabete dayalı tersine çevrilebilirliği ile ilgilidir, bu da anestezik derinliğin kontrolünde bir iyileşmeye, daha kısa bir uyanma evresine ve daha az hipotermi oluşumuna yol açar (Astner 1998; Henke ve ark. 2005; Baumgartner 2010).

Anesteziklerin doğrudan vasküler etkilerinin incelenmesi için ultrasonografi gibi görüntüleme teknikleri uygulanabilir (Lee ve ark. 1990; Baumgartner ve ark. 2008; Baumgartner ve ark. 2010). Anestezik ilaçların, kardiyovasküler sistemin çeşitli verileri (örneğin, kan basıncı, ventriküler kasılma ve kalp hızı) üzerinde farklı etkiler oluşturduğu iyi bilinmektedir ve çoğu hastada görünür bir doz-yanıt ilişkisi vardır (Smith 2009; Rıha ve ark. 2012).

Prospektif çalışmaları değerlendiren son zamanlardaki literatür bilgileri, insanlarla karşılaştırıldığında (Lunn ve Mushin 1982; Rasis ve ark. 2005) köpeklerde ve kedilerde (Dyson ve Maxie 1999; Rasis ve ark. 2005) anestezi ile birlikte intraoperatif morbidite ve mortalitenin daha fazla olduğunu göstermektedir. Çeşitli anestezik ajanların köpek kardiyovasküler fonksiyonu üzerindeki etkileri ve bunların intraoperatif ölümlere katkıları konusunda çalışmalar yapılmıştır (Dyson ve Maxie 1999; Rasis ve ark. 2005).

Kediler için kardiyak morfoloji ve fonksiyonun normal değerleri yayınlanmıştır (Allen 1982). Bununla birlikte, değişik anestezik prosedürlerin uygulandığı kedilerde kardiyak fonksiyon ve morfoloji ile ilgili makaleler eksiktir. Derin kardiyovasküler etkilerin belirlenmesi geçmiş araştırmalarda istikrarlı bir bulgu olmuştur. Bununla birlikte, kedilerde MED-KET ve KSZ-KET anestezi prosedürlerinin doğrudan kardiyovasküler etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın hipotezi, kardiyak fonksiyon ve morfolojinin hem medetomidin/ketamin hem de ksilazin/ketamin anestezisinden etkilendiğidir.

Bu çalışmanın amacı, MED-KET ve KSZ-KET anestezisindeki kedilerde kısa süreli kardiyovasküler etkilerini ve atipamazol ile bu etkilerinin geri dönüşümünü ekokardiyografi tekniği ile araştırmaktır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Manas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 17.03.2016 tarihinde 2016-03/2 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Çalışmaya canlı ağırlıkları 2.2 ile 3.6 kg; yaşları 0.5 ile 5.5 arasında olan 20 dişi kedi dahil edildi. Bu kediler 4 aylık bir süre içerisinde kliniğimize ovariohisterektomi operasyonu için getirilmiştir.

Anestezi

Kediler, her grupta on kedi olacak şekilde iki gruptan birine rastlantısal olarak dahil edildi (T0, başlangıç). Grup 1'de (T1: premedikasyondan sonraki 10. dk) kedilere medetomidin 80 μ g/kg kasiçi (Kİ (Tomidin, Provet, Türkiye) ve 2 mg/kg Kİ ketamin hidroklorür (Alfamin, Egevet, Türkiye) ile karıştırılarak tek enjeksiyonla anestezi başlatıldı. Benzer şekilde 2. gruptaki kedilere ksilazin hidroklorür 2 mg/kg Kİ (Alfamin, Egevet, Türkiye) ve ketamin hidroklorür 10 mg/kg Kİ (Alfamin, Egevet, Türkiye) ile karıştırılarak tek enjeksiyonla uygulandı. Elektrokardiyogram, kalp hızı, solunum hızı, non-invaziv kan basıncı ve periferik oksijen düzeyi anestezi boyunca izlendi (Guoteng Co Ltd, Çin) (T2: operasyon başlangıcından sonraki 15. dk; T3: son dikeş sonrası). Ovaryohisterektomi prosedürünün sonunda, anestezi atipamezol 200 μ g/kg Kİ (Reversal, Provet, Türkiye; T4: atipamezol enjeksiyonu sonrası 10. dk) kullanılarak tersine çevrildi.

Ekokardiyografi

Her kedi, ultrasonografik ölçümler için ön hazırlık olarak traş edildi. 2D ve M-mod ekokardiyografi ölçümleri, kediler sağ lateral yatar pozisyondayken yapıldı. Ekokardiyografi için 7.0 MHz mikrokonveks prob kullanıldı. Prob bir ultrasonografik sistem (SIUI, G. Kore) ile birlikte kullanıldı. Kardiyak verilerdeki değişiklikleri araştırmak için kalbin ekokardiyografik değerleri değerlendirildi. Kalp başlangıçta sağ parasternal kısa eksen düzleminde 2D mod ile görüntüledi. Bu görüntüden, sol ventrikülün arka duvarına dik olarak papiller kaslar ve interventriküler septum seviyesinde bir M-mod klavuz çizgisi yerleştirildi. Odacık ölçümleri, M mod görüntüleriyle yapıldı. Sol ventrikül sistol sonu çapı (LVSD), arka duvarın tepe yukarı defleksiyonu noktasında, arka duvar kalınlığı ise sistol sonunda ölçüldü. Ekokardiyografik incelemede, ultrasonografi cihazının ekardiyograf yazılımı tarafından hesaplanan fraksiyonel kısalma (FS), sol ventrikül çapı % (%LVD) ve ejeksiyon fraksiyonu (EF) ölçüldü. Ölçümler T0, T1, T3 ve T4 zaman noktalarında (T2 hariç) gerçekleştirilmiştir.

M-mod ve 2D ekokardiyografide sistolik fonksiyon değerleri anestezi indüksiyonundan önce ve ardından T0, T1, T3 ve T4 zaman noktalarında (T2 hariç) değerlendirildi. Kedilerin grup ataması hakkında bilgilendirilmeyen aynı araştırmacı, tüm ekokardiyografileri gerçekleştirdi. Ekokardiyografik değerler anestezi protokollerinin etkileri ile ilişkiliydi. Bu değerler, T2 zaman noktası hariç her zaman noktası için hesaplanmıştır. Her hayvanın verileri istatistiksel değerlendirmeye dahil edildi. Hiçbir hasta çalışmadan çıkarılmadı.

Operasyonlar ve Verilerin İzlenmesi

Hayvanlar anestezi sırasında spontan olarak solumaya devam ettiler. Hebir hastanın kalp hızı, solunum hızı, non-invaziv kan basıncı ve periferik oksijen düzeyi T0, T1, T2, T3 ve T4 zaman aralıklarında monitörize (Guoteng Co Ltd, Çin) edilerek izlendi (veriler gösterilmemiştir). Bu

fizyolojik veriler, T2 zaman noktası hariç ultrasonografik muayene ile eş zamanlı olarak kaydedildi.

Kedilerde T1 zaman noktası sonrası ovariohisterektomi yapıldı. Her ameliyat aynı jinekolog tarafından veteriner öğrencileriyle birlikte yapıldı. Operasyon sırasında başka bir anesteziik veya analjezik ilaç uygulanmadı. Ameliyattan 24 saat sonra tüm kediler taburcu edildi.

İstatistiksel Analiz

Sayısal verilerin istatistiki olarak incelenmesi için ortalama \pm standart hata (SH) değerleri kullanıldı. Örneklem büyüklüğü küçük olduğundan ve veriler normal dağılmadığından, istatistiksel analiz parametrik olmayan testler kullanılarak yapıldı. İlacın etkilerinin medyan değerlerden farklı olup olmadığını test etmek için Friedman testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile, ölçümler arasındaki farklar ise Wilcoxon testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık, eşit varyans ve iki tarafı güven aralığı varsayımıyla $p < 0.05$ olasılık değeri oluşturulmuştur. İstatistiksel analizler SPSS Version 22.0 kullanılarak yapıldı (SPSS Inc., IBM Company, 233 S. Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606).

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hayvanların demografik bilgileri (vücut ağırlığı, vücut kondisyon skoru ve yaş) karşılaştırıldığında başlangıç ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo 1).

Tablo 1. Her iki grup için hayvanların verileri ve başlangıçtaki fizyolojik değerler (Ort \pm SH).

Table 1. Animal data and baseline (T0) physiological variables for both groups (Mean \pm SE).

| Olgu verileri | MED-KET | KSZ-KET | p |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-------|
| BW (kg) | 2.55 \pm 0.13 | 2.88 \pm 0.10 | 0.071 |
| BCS | 2.67 \pm 0.21 | 3.0 \pm 0.00 | 0.111 |
| Age (years) | 1.00 \pm 0.30 | 2.86 \pm 0.72 | 0.140 |
| Baseline HR (beats/minute) | 162.00 \pm 58.00 | 125.67 \pm 25.06 | 0.560 |
| Baseline RR (breaths/min) | 12.00 \pm 1.00 | 13.0 \pm 0.88 | 0.942 |
| Baseline BP (mmHg) | 117.50 \pm 10.50 | 104.00 \pm 7.21 | 0.092 |
| Baseline SPO ₂ (mmHg) | 94.00 \pm 1.15 | 92.00 \pm 0.00 | 0.078 |

BCS: vücut kondisyon skoru; BP: kan basıncı; BW: vücut ağırlığı; HR: kalp atımı; RR: solunum sayısı; SPO₂: oksijen düzeyi.

Olgularda tespit edilen kalp hızı, solunum hızı, non-invaziv kan basıncı ve periferik oksijen düzeyi başlangıç ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Tüm fizyolojik başlangıç (T0) verileri, kediler için beklenen referans aralıkları içindeydi (Tablo 1).

MED-KET ve KSZ-KET grubundaki ardışık sistolik fonksiyonel değişiklikler Tablo 2'de karşılaştırılmıştır. MED-KET grubunda medetomidin ve ketamin enjeksiyonundan sonra sistol sonu hacim önemli ölçüde artmıştır. Zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,006$). Başlangıç ile karşılaştırıldığında T1 ve T3'te istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (sırasıyla T1, T3'de T0'a karşı; $p=0,0287$ ve $p=0,018$); ancak değerler T4'e göre başlangıçtan önemli ölçüde farklı değildi (sırasıyla T0, T1'e karşı T4 $p=0,128$ ve $p=0,075$). Sol ventrikül EF, T1 ve T3'te (sırasıyla $p=0,028$ ve $p=0,018$) T0'dan önemli ölçüde azaldı ve T4'te ($p=0,091$) başlangıç değerlerine döndü. Sol ventrikül EF anlık olarak düşmesine rağmen, çeyrek değeri kabul edilebilir sistolik

fonksiyon içindeydi [T1: 69.2 (64.2-83.6), T3: 69.0 (56.0-79.8)].

KSZ-KET grubu içinde, sol ventrikül arka duvarı kalınlığı ksilazin ve ketamin uygulamasından sonra önemli ölçüde azaldı (sırasıyla, T1, T3 değeri başlangıç ile karşılaştırıldığında, $p=0,043$ ve $p=0,091$); daha sonra T4'teki başlangıç değerine döndü (başlangıç ve T1'e karşı T4, $p=0,735$ ve $p=0,043$). %LVD, T0'dan T1 ve T3'te önemli ölçüde azaldı (sırasıyla $p=0,018$ ve $p=0,176$); ve T4'te başlangıç değerlerine döndü ($p=0,499$). Sol ventrikül EF'de benzer değerler gözlemlendi (T1, T3, T4'e karşı T0: 85.0, 66.1, 71.8, 90.1, $p=0,018$, 0.091 ve 0.499, sırasıyla; T1'e karşı T4, $p=0,018$). Sol ventrikül EF anlık olarak düşmesine rağmen, çeyrek değeri kabul edilebilir sistolik fonksiyon içindeydi [T1: 66.1 (48.7-93.1), T3: 71.8 (31.8-98.4)].

MED-KET ve KSZ-KET grupları arasındaki sistolik fonksiyon üzerindeki etkinin karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmektedir. Her iki grup, anestezi indüksiyonundan sonra %LVD ve sol ventrikül EF'sinde düşüş gösterdi (başlangıç ve T1, tümü, $p < 0,05$); bununla birlikte, %LVD ve sol ventrikül EF'nin azalış değeri ve başlangıç değeri, gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık gösterdi. %LVD'de, başlangıç verileri 2 grup arasında benzerdi ($p=0,949$, birincil düşüş T1 ve T3'te (sırasıyla $p=0,443$, $p=0,609$), ancak bu noktadan sonra KSZ-KET grubu %LVD kontrolü aşamasında daha yüksek bir normale dönüş gösterdi [T4: 41.90 (23.10-63.30), $p=0,029$] (Tablo 2). Sol ventrikül EF'de karşılaştırılabilir bir değer gösterildi: başlangıç ve başlangıç T1 ve T3'teki azalma 2 grup arasında benzerdi ($p=0,949$, 0.371 ve 0.609); yine de bu noktadan sonra KSZ-KET grubu normale dönüş gösterdi ve önemli ölçüde ileri dereceli sol ventrikül EF'si MED-KET'dekilerle karşılaştırıldı [T4: 73.33 (63.60-93.50), $p=0,029$] (Tablo 2).

MED-KET ve KSZ-KET grubundaki seri M-modu ekokardiyografik değişiklikler Tablo 3'te karşılaştırılmıştır. MED-KET grubu içinde LVIDd, medetomidin ve ketamin enjeksiyonundan sonra önemli ölçüde artmıştır. Zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p=0,049$). T3 ile T0 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (T3 ve T0, $p=0,028$); ancak bu, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaksızın T4'te düzeldi (sırasıyla T0, T1 ve T4 $p=0,176$ ve $p=0,128$).

Sistol sonunda sol ventrikülün iç çapı (LVIDs), T1 ve T3'teki başlangıç değerinden (sırasıyla $p=0,028$, $p=0,018$) önemli ölçüde arttı ve T4 ile başlangıç değerine döndü ($p=0,128$). T1 ve T3'te T4'e karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (sırasıyla T1, T3'e karşı T4 $p=0,028$, $p=0,018$), ancak T0'a karşı T4'te istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,128$).

Sistol sonu interventriküler septum kalınlığı (IVSs), medetomidin ve ketamin enjeksiyonundan sonra önemli ölçüde arttı. T4'e karşı T0'da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (T4'e karşı T0, $p=0,043$). KSZ-KET grubu içinde, LVIDs, ksilazin ve ketamin uygulamasından sonra önemli ölçüde arttı (sırasıyla T1, T3'e karşı başlangıç, $p=0,028$ ve $p=0,091$), ancak daha sonra T3'te başlangıç değerine geri döndü (başlangıç, T1'e karşı T4, $p=0,398$ ve $p=0,063$, sırasıyla). T1'e karşı T0'da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p=0,028$), ancak T3 ve T4'te T0'a karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla T3, T4'e karşı T0, $p=0,091$ ve $p=0,398$).

MED-KET ve KSZ-KET grupları arasındaki M-mod ekokardiyografiye etkisinin karşılaştırılması Tablo 3'te sunulmuştur. Gruplar arasında zaman içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi.

Tablo 2. MED-KET ve KSZ-KET grubunda seri sistolik fonksiyon verilerindeki değişimler.**Table 2.** The serial systolic functional changes in MED-KET and XYZ-KET group.

| | Group | T0 | T1 | T3 | T4 | p |
|-------|---------|---------------|---------------------------|---------------|----------------------------|-------|
| IVS% | MED-KET | 33.05 ± 5.25 | 36.10 ± 6.41 | 35.76 ± 4.69 | 40.55 ± 3.21 | 0.482 |
| | KSZ-KET | 50.00 ± 6.37 | 37.16 ± 3.93 | 33.87 ± 6.27 | 40.17 ± 4.12 | |
| | p | 0.200 | 0.798 | 0.898 | 0.847 | |
| LVPW% | MED-KET | 75.69 ± 10.73 | 43.14 ± 6.70 | 63.35 ± 6.66 | 54.80 ± 17.25 | 0.848 |
| | KSZ-KET | 81.82 ± 16.84 | 39.55 ± 5.34 [†] | 54.94 ± 14.91 | 89.61 ± 17.92 [†] | |
| | p | 0.848 | 0.749 | 0.522 | 0.223 | |
| LVD% | MED-KET | 55.63 ± 4.46 | 36.27 ± 2.69 | 36.44 ± 2.41 | 41.90 ± 5.34 | 0.371 |
| | KSZ-KET | 53.99 ± 5.65 | 35.30 ± 4.99 [†] | 44.33 ± 9.03 | 60.59 ± 5.11 [†] | |
| | p | 0.949 | 0.443 | 0.609 | 0.029 | |
| EDV | MED-KET | 3.09 ± 0.49 | 13.29 ± 8.9 | 5.39 ± 0.41 | 3.79 ± 0.40 | 0.481 |
| | KSZ-KET | 4.45 ± 0.87 | 6.65 ± 1.45 | 5.41 ± 1.13 | 4.73 ± 0.52 | |
| | p | 0.224 | 0.522 | 0.749 | 0.276 | |
| ESV | MED-KET | 0.43 ± 0.15 | 2.82 ± 1.36* | 1.73 ± 0.23* | 0.88 ± 0.14 | 0.798 |
| | KSZ-KET | 0.59 ± 0.18 | 2.62 ± 0.74 | 2.09 ± 0.89 | 0.50 ± 0.15 | |
| | p | 0.650 | 0.522 | 0.798 | 0.158 | |
| SV | MED-KET | 2.67 ± 0.38 | 4.41 ± 7.55 | 3.62 ± 0.29 | 2.90 ± 0.52 | 0.482 |
| | KSZ-KET | 3.88 ± 0.79 | 4.02 ± 0.83 | 3.31 ± 0.42 | 4.21 ± 0.44 | |
| | p | 0.249 | 0.564 | 0.749 | 0.124 | |
| EF | MED-KET | 87.36 ± 3.18 | 69.23 ± 2.60* | 69.05 ± 3.05* | 73.33 ± 5.39 | 0.522 |
| | KSZ-KET | 85.06 ± 4.37 | 66.11 ± 5.77 [†] | 71.80 ± 9.81 | 90.17 ± 2.95 [†] | |
| | p | 0.949 | 0.371 | 0.609 | 0.029 | |
| CO | MED-KET | 0.57 ± 0.07 | 1.71 ± 1.35 | 0.48 ± 0.08 | 0.50 ± 0.15 | 0.655 |
| | KSZ-KET | 0.77 ± 0.21 | 0.58 ± 0.13 | 0.43 ± 0.09 | 0.61 ± 0.19 | |
| | p | 0.564 | 0.478 | 0.897 | 0.653 | |

CO: Kardiyak çıkış; EDV: diyastol sonu hacim; ESV: sistol sonu hacim; EF: ejeksiyon fraksiyonu; %IVS: interventriküler septum fraksiyonel kalınlığı %; %LVD: sol ventrikül kalınlığı %; %LVPW: sol ventrikül arka duvar kalınlığı %; SV: vurum hacmi *p<0.05: T0 ile karşılaştırıldığında gruptaki fark, †p<0.05: T1 ile karşılaştırıldığında T4 de gruptaki fark.

Tablo 3. MED-KET ve KSZ-KET grubunda seri M mod ekokardiyografik veriler.**Table 3.** The serial M-mode echocardiographic changes in MED-KET and XYZ-KET group.

| | Group | T0 | T1 | T3 | T4 | p |
|-------|---------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|-------|
| LVIDd | MED-KET | 11.41 ± 0.72 | 17.39 ± 3.69 | 14.14 ± 0.55* | 12.44 ± 0.50 | 0.949 |
| | KSZ-KET | 13.57 ± 1.14 | 14.49 ± 1.51 | 14.45 ± 1.02 | 13.53 ± 0.59 | |
| | p | 0.133 | 0.810 | 0.873 | 0.271 | |
| LVIDs | MED-KET | 5.11 ± 0.71 | 10.41 ± 1.50* | 9.24 ± 0.45* | 7.08 ± 0.51 [†] | 0.609 |
| | KSZ-KET | 6.07 ± 0.75 | 9.76 ± 1.53* | 9.05 ± 1.71 | 5.30 ± 0.77 | |
| | p | 0.431 | 0.810 | 0.936 | 0.099 | |
| PWd | MED-KET | 4.48 ± 0.34 | 5.17 ± 0.64 | 5.08 ± 1.02 | 4.79 ± 0.43 | 1.000 |
| | KSZ-KET | 4.80 ± 0.39 | 5.44 ± 0.65 | 5.08 ± 0.24 | 4.81 ± 0.65 | |
| | p | 0.520 | 0.810 | 0.261 | 0.854 | |
| PWs | MED-KET | 7.65 ± 0.22 | 7.40 ± 0.76 | 7.30 ± 0.90 | 7.20 ± 0.54 | 0.250 |
| | KSZ-KET | 8.61 ± 0.48 | 7.57 ± 0.83 | 8.33 ± 0.94 | 9.18 ± 1.09 | |
| | p | 0.115 | 0.810 | 0.469 | 0.199 | |
| IVSd | MED-KET | 3.45 ± 0.34 | 3.20 ± 0.57 | 3.33 ± 0.32 | 3.68 ± 0.47 | 0.898 |
| | KSZ-KET | 3.10 ± 0.39 | 3.34 ± 0.49 | 3.52 ± 0.36 | 4.21 ± 0.33 | |
| | p | 0.474 | 0.747 | 0.629 | 0.461 | |
| IVSs | MED-KET | 5.33 ± 0.58 | 6.04 ± 1.78 | 5.52 ± 0.50 | 6.32 ± 0.59* | 0.201 |
| | KSZ-KET | 6.68 ± 0.33 | 5.51 ± 0.86 | 5.66 ± 0.54 | 7.24 ± 0.31 | |
| | p | 0.073 | 0.936 | 0.873 | 0.580 | |

IVSd: diyastol sonu interventriküler septum kalınlığı; IVSs: sistol sonu interventriküler septum kalınlığı; LVIDd: diyastol sonu sol ventrikül çapı; LVIDs: sistol sonu sol ventrikül çapı; PWd: diyastol sonu arka duvar kalınlığı; PWs: sistol sonu arka duvar kalınlığı. *p<0.05: T0 ile karşılaştırıldığında grup içindeki fark, †p<0.05: T1 ile T3 arasında gruptaki fark.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Anestezik ilaçlar doğrudan ve dolaylı olarak hemodinamik ve kardiyak performansı etkiler (Hanatani ve ark. 1998; Yang ve ark. 1999; Roth ve ark. 2002; Kawahara ve ark. 2005). Anestezik ilaçlar, patofizyolojik ve fizyolojik durum ile bu verilerdeki değişiklikleri değerlendirirken önemli bir ajandır. İzofluran, pentobarbital, dexmedetomidine ile ketamin ve ksilazin kombinasyonu gibi birçok anestezik ilaç, kedilerin kalp fonksiyonunun ekokardiyografi ile saptanması için sıklıkla kullanılır (Allen 1982; Dyson ve Maxie 1999; Zatroch ve ark. 2019).

Bu çalışma; iki farklı anestezi protokolünün kedilerde kardiyovasküler fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin ve bu etkilerin atipamezol kullanılarak tersine çevrilmesinin ekokardiyografik muayene ile karşılaştırılması amacıyla yapıldı.

Ketamin, dissosiyatif bir anestezik durumda çalışan bir N-metil-D-asparat reseptör antagonisti olarak adlandırılır. Kalp üzerindeki uyarıcı semptomimetik ve parasempatik sistem etkileri üzerindeki önleyici etkilerin kombinasyonu nedeniyle, ketamin arteriyel basıncı ve kalp hızını artırmak için üretilmiştir. Arter basıncındaki artışın kardiyak debideki artışla birleştiği, ancak atım hacminde değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Baumgartner ve ark. 2010a). Riou ve ark. (1990), ketaminin miyokard üzerinde muhtemelen sarkoplazmik retikulumun bozulmuş işlevi nedeniyle negatif bir inotropik etki ve artan Ca₂₊ akışıyla ilişkili pozitif bir inotropik etkiye dayanan ikili bir karşıt etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu çalışmada ketamin uygulaması azalmış sol ventrikül fonksiyonu ile ilişkili bulundu. Düşüş, sempatik tonusun kesilmesine bağlı olarak ikincil olabilir. Sistolik fonksiyon verilerinden EF değerinde T0 ile karşılaştırıldığında T1 zaman noktasında hem MED-KET hem de KSZ-KET grubunda; LVPW% ve LVD% değerlerinde KSZ-KET grubunda; ESV değerinde ise MED-KET grubunda istatistiki olarak anlamlı fark olduğu belirlendi.

MED-KET anestezisi, T1 ve T3 zaman noktalarında hem EF'de önemli ölçüde bir düşüş hem de ESV değerinde artışı sağladı. Bunun esas olarak kalp hızındaki düşüşün bir sonucu olabileceği düşünüldü. KSZ-KET anestezisi ise, T1 zaman noktasında hem EF'de hem de % LVD'de önemli bir düşüş sağladı.

Atipamezol kimyasal olarak 4-(2-etil-2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1H-imidazol-hidroklorür olarak tanımlanır. Hem merkezi hem de periferel a2-adrenoreseptörlerinde rekabetçi, güçlü, oldukça seçici bir antagonisttir (Ancrenaz 1994; Zatroch ve ark. 2019). Atipamezol, köpeklerde medetomidin veya MED-KET anestezisini tersine çevirmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Talukder ve ark. 2009). Sunulan bu çalışmada MED-KET grubunda sistolik fonksiyon verilerinden ESV ve EF ortalamaları T3 zaman noktasında başlangıç değerlerinden istatistiki olarak anlamlı farklılıkta iken; atipamezol uygulaması sonrasında T4 zaman noktasında anestezi öncesi değerlerine geri dönüş sağlandı. Yine MED-KET grubunda M mod ekokardiyografide belirlenen LVIDd ve LVIDs ortalamaları operasyon bitiminde (T3) başlangıç değerlerinden istatistiki olarak anlamlı farklılıkta iken; atipamezol uygulaması sonrasında T4 zaman noktasında anestezi öncesi değerlerine geri dönüş sağlandı.

Sonuç olarak, kedilerde MED-KET ve KSZ-KET ile anestezi sonrası ekokardiyografik değerlerin anlamlı düzeyde

etkilendiği ve atipamezolün ovariohisterektomi gibi abdominal cerrahiler sonrasında hızlı ve güvenli bir şekilde başlangıç değerlerine dönüş için faydalı olabileceği kanısına varıldı.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışma Manas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 17.03.2016 tarihinde 2016-03/2 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MK
Denetleme/Danışmanlık: ZÖ
Veri Toplama ve/veya İşleme: MK, AZ
Analiz ve/veya Yorum: ZÖ
Makalenin Yazımı: MK
Eleştirel İnceleme: ZÖ

KAYNAKLAR

- Allen DG (1982). Echocardiographic study of the anesthetized cat. *Can J Comp Med*, 46 (2), 115-122.
- Anandmay AK, Dass LL, Sharma AK, Gupta MK, et al (2016). Clinico-anesthetic changes following administration of propofol alone and in combination of meperidine and pentazocine lactate in dogs. *Vet World*, 9 (11), 1178-1183.
- Ancrenaz M (1994). Use of Atipamezole to Reverse Xylazine Tranquilization in Captive Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*). *J Wild Dis*, 30 (4), 592-595.
- Astner S (1998). *Vergleich intramuskulärer verabreichter Kombinationsanästhesien beim Kaninchen Xylazin/Ketamin, Medetomidin/Ketamin, Medetomidin/Fentanyl/ Midazolam [PhD dissertation]*. Munich, Germany: Ludwig Maximilians University of Munich.
- Baumgartner C, Bollerhey M, Ebner J, et al (2010). Effects of ketamine-xylazine intravenous bolus injection on cardiovascular function in rabbits. *Can J Vet Res*, 74 (3), 200-208.
- Baumgartner C, Bollerhey M, Ebner J, et al (2010). Effects of medetomidine-midazolam-fentanyl IV bolus injections and its reversal by specific antagonists on cardiovascular function in rabbits. *Can J Vet Res*, 74 (4), 286-298.
- Baumgartner C, Bollerhey M, Henke J, et al (2008). Effects of propofol on ultrasonic indicators of haemodynamic function in rabbits. *Vet Anaesth Analg*, 35 (2), 100-112.
- Bergman SA (1999). Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesth Prog*, 46 (1), 10-20.
- Dyson DH, Maxie MG (1999). Morbidity and mortality associated with anesthetic management in small animal veterinary practice in Ontario. *J Anim Hosp Assoc*, 35 (4), 325-335.
- Erhardt W, Wohlrab S, Kılıç N, Werner C, Henke J (2001). Comparison of the anaesthesia combinations racemic-ketamine/medetomidine and S-Ketamine-medetomidine in syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Vet Anaesth*, 28 (4), 212-213.
- Hanatani A, Yoshiyama M, Takeuchi K, et al (1998). Angiotensin II type 1-receptor antagonist candesartan cilexetil prevents left ventricular dysfunction in myocardial infarcted rats. *Jpn J Pharmacol*, 78 (1), 45-54.
- Henke J, Astner S, Brill T, et al (2005). Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/ midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits. *Vet Anaesth Analg*, 32 (5), 261-270.
- Hollis AR, Pascal M, Van Dijk J, Jolliffe C, Kaartinen J (2020). Behavioural and cardiovascular effects of medetomidine constant rate infusion compared with detomidine for standing sedation in horses. *Vet Anaesth Analg*, 47 (1), 76-81.
- Hopster K, Wittenberg-Voges L, Kästner SBR (2017). Xylazine infusion in isoflurane-anesthetized and ventilated healthy horses: Effects on cardiovascular parameters and intestinal perfusion. *Can J Vet Res*, 81 (4), 249-254.
- Kawahara Y, Tanonaka K, Daicho T, et al (2005). Preferable Anesthetic Conditions for Echocardiographic Determination of Murine Cardiac Function. *J Pharmacol Sci*, 99 (1), 95-104.
- Kılıç N, Henke J, Pragst I, Erhardt W (2001). Comparison of three different medetomidin/ketamin combinations in NMRI mice. *J Vet*

- Anaest*, 28 (4), 211-212.
- Kılıç N (2004)**. A Comparison between Medetomidine-Ketamine and Xylazine-Ketamine Anaesthesia in Rabbits. *Turk J Vet Anim Sci*, 28 (5), 921-926.
- Kılıç N, Henke J, Erhardt W (2004)**. Ketamine-medetomidine anaesthesia beim hamsters (mesocricetus auratus): ein klinischer Vergleich zwischen subkutaner und intraperitonealer Applikation. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 32, 384-388.
- Lee SW, Hankes GH, Purohit RC, et al (1990)**. Comparative study of ultrasonography and arteriography of the carotid artery of xylazine-sedated and halothane-anesthetized goats. *Am J Vet Res*, 51 (1), 109-113.
- Lee C, Jones TA (2018)**. Effects of Ketamine Compared with Urethane Anesthesia on Vestibular Sensory Evoked Potentials and Systemic Physiology in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 57 (3), 268-277.
- Lin J, Figuerado Y, Montgomery A ve ark. (2021)**. Efficacy of ketamine for initial control of acute agitation in the emergency department: A randomized study. *Am J Emerg Med*, 44, 306-311.
- Lunn JN, Mushin WW (1982)**. Mortality associated with anaesthesia. *Anaesthesia*, 37 (8), 856.
- Melanie B (2005)**. Sonographische Darstellung des Einflusses der Injektionsnarkose Methoden Propofol, Ketamin-Xylazin oder Medetomidin Midazolam-Fentanyl auf die Vasoaktivität und Hämodynamik beim Kaninchen. Inaugural-Dissertation, München.
- O'Gara BP, Beydoun NY, Mueller A, Kumaresan A, Shaefi S (2022)**. Anesthetic Preferences for Cardiac Anesthesia: A Survey of the Society of Cardiovascular Anesthesiologists. *Anesth Analg*, doi: 10.1213/ANE.0000000000006147.
- Raisis AL, Blissitt KJ, Henley W, et al (2005)**. The effects of halothane and isoflurane on cardiovascular function in laterally recumbent horses. *Brit J Anaesth*, 95 (3), 317-325.
- Říha H, Papoušek F, Neckář J, et al (2012)**. Effects of Isoflurane Concentration on Basic Echocardiographic Parameters of the Left Ventricle in Rats. *Physiol Res*, 61 (4), 419-423.
- Riou B, Viars P, Lecarpentier Y (1990)**. Effects of ketamine on the cardiac papillary muscle of normal hamsters and those with cardiomyopathy. *Anesthesiology*, 73 (5), 910-918.
- Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, et al (2002)**. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282 (6), 2134-2140.
- Salla KM, Tuns CJ, Bennett RC ve ark. (2017)**. Cardiovascular effects of premedication with medetomidine alone and in combination with MK-467 or glycopyrrolate in dogs subsequently anesthetized with isoflurane. *Am J Vet Res*, 78 (11), 1245-1254.
- Simonini A, Brogi E, Cascella M, Vittori A (2022)**. Advantages of ketamine in pediatric anesthesia. *Open Med (Wars)*, 17 (1), 1134-1147.
- Smith TC (2009)**. Hypnotics and intravenous anaesthetic agents. In: Fundamentals of Anaesthesia. Smith TC, Pinnock C, LIN T (eds), 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2009, pp 569-583.
- Talukder H, Hikasa Y, Takahashi H, et al (2009)**. Antagonistic effects of atipamezole and yohimbine on medetomidine-induced diuresis in healthy dogs. *Can J Vet Res*, 73 (4), 260-270.
- Wessler B, Madias C, Pandian N, et al (2011)**. Short term effects of ketamine and isoflurane on left ventricular ejection fraction in an experimental swine model. *ISRN Cardiol*, 2011, 582658.
- Vilar JM, Batista M, Pérez R ve ark. (2018)**. Comparison of 3 anesthetic protocols for the elective cesarean-section in the dog: Effects on the bitch and the newborn puppies. *Anim Reprod Sci*, 190, 53-62.
- Yang X-P, Liu Y-H, Rhaleb N-E, et al (1999)**. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 277 (5), 1967-1974.
- Zatroch KK, Sakai DM, Parry S, Campoy L, Martin-Flores M (2019)**. Evaluation of atipamezole as a treatment for dexmedetomidine-induced cardiovascular depression in anesthetized cats. *Am J Vet Res*, 80 (5), 455-460.



The Effect of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Serum Mineral and Vitamin Levels in Rats with Experimental Fluorosis

Uğur ÖZDEK^{1,*} İbrahim Hakkı YÖRÜK² Yeter DEĞER³

¹ Van Yuzuncu Yil University, Vocational School of Health Services, 65040, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 65040, Van, Turkey

³ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 65040, Van, Turkey

Received: 13.08.2022

Accepted: 11.10.2022

ABSTRACT

Fluorine toxicity occurs in different parts of the world. It is caused by the increase in the fluorine level in the waters, especially due to the dissolution of volcanic rocks over time. Water with high fluorine content can be taken with plant and animal irrigations, and foods obtained from plants and animals, or it can be taken directly with drinking water. In this study, the effects of chitosan (CS) and chitosan oligosaccharide (COS) on some serum trace minerals and vitamin levels in experimental fluorosis rats were investigated. Six groups were formed as control, fluorosis, fluorosis CS and COS groups, healthy CS and COS groups. CS and COS were administered orally for 28 days at a dose of 250 mg/kg. At the end of the study, ketamine anesthesia was administered and the heart was directly cannulated. Trace minerals (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) and vitamins (retinol, α -tocopherol, D₃) were analyzed. Cu, Zn, Se and Mn levels were found to be decreased in the F group compared to the control group. A significant increase was found in the Zn level in the F+CS group and in the Cu, Zn and Se levels in the F+CS group compared to the values in the F group. Serum retinol and α -tocopherol levels were decreased in the F, F+CS, F+COS and CS groups. In conclusion, our findings showed that there was a decrease in serum Zn, Cu, Se, retinol and α -tocopherol levels in rats with fluorosis, and COS was more effective than CS against the decrease in mineral and vitamin levels.

Keywords: Fluorosis, Serum, Sodium fluoride, Trace elements, Vitamin.

ÖZ

Deneysel Florozis Oluşturulan Ratlarda Serum Mineral ve Vitamin Seviyeleri Üzerine Kitosan ile Kitosan Oligosakkaritin Etkisi

Flor toksikasyonu dünyanın farklı yerlerinde meydana gelir. Özellikle volkanik kayaların zamanla çözünmesi nedeniyle sulardaki flor seviyesinin artmasından kaynaklanır. Flor içeriği yüksek olan sular ile bitkilerin sulanması, hayvanların bu suları tüketmesi sonrası, bitki ve hayvanlardan elde edilen besinlerle veya doğrudan içme suyuyla alınabilir. Bu çalışmada, deneysel florozisli ratlarda kitosan (CS) ve kitosan oligosakkaritin (COS) bazı serum eser mineralleri ve vitamin düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı. Kontrol, florozis, florozis CS ve COS grupları, sağlıklı CS ve COS grupları olmak üzere altı grup oluşturulmuştur. CS ve COS, 250 mg/kg'lık bir dozda, 28 gün boyunca oral yoldan uygulandı. Çalışmanın sonunda ketamin+ksilazin anestezisi uygulandı ve kalp direkt kanüle edildi. Serumda eser mineraller (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) ve vitaminler (retinol, α -tokoferol, D₃) analiz edildi. Florozis grubunda (F), kontrol grubuna göre Cu, Zn, Se ve Mn seviyelerinde azalma olduğu görüldü. F+CS grubunda Zn seviyesinde ve F+CS grubunda Cu, Zn ve Se seviyelerinde F grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi. F, F+CS, F+COS ve CS gruplarında serum retinol ve α -tokoferol seviyeleri azaldı. Sonuç olarak, bulgularımız florozisli ratlarda serum Zn, Cu, Se, retinol ve α -tokoferol düzeylerinde azalma olduğunu, mineral ve vitamin düzeylerindeki azalmaya karşı COS'un CS'den daha etkili olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Eser elementler, Florozis, Serum, Sodyum florür, Vitamin.

*Corresponding author: ugurozdek@yyu.edu.tr



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

INTRODUCTION

Since fluorine has a high electronegative property, it is found in nature in the form of salt (fluoride) by combining with other elements. These salts are solids such as sodium fluoride (NaF) and calcium fluoride (CaF₂). Fluorides found in natural drinking water are the biggest source of fluorine taken into the body. The highest possible amount of fluoride in water is stated by the World Health Organization as 1.5 mg/L. Consumption of drinking water with fluorine above these values for a long time causes fluorine toxicity called fluorosis (Varol and Varol 2010; Cetin et al. 2020). In fluorosis, oxidative stress is induced by reactive oxygen species (ROS), which directly react with biomolecules, damaging lipids, proteins and DNA, causing cell and/or organ damage (Yur et al. 2013).

Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and vitamins (vitamin C, vitamin E and β -carotene) have great importance in protection against this damage (Yur et al. 2013). The relationship between ROS formation, antioxidant defense systems and lipid peroxidation in fluorosis has been extensively investigated, but different results have been obtained (Reddy et al. 2003). In fluorosis, vitamins A, C and E help protect the organism from the harmful effects of oxidative radicals. At the same time, vitamin D plays an important role in improving fluoride-induced toxicity (Altug et al. 2013). Dietary antioxidants and consumption of antioxidant-rich foods have a beneficial effect on alleviating oxidative stress in fluorosis (Mesram et al. 2017; Bulduk et al. 2022). CS, which is used as a natural antioxidant, is obtained by deacetylating the biopolymer chitin. COS obtained by the reduction of CS or chitin have a strong antioxidant effect. In addition, COS and CS have biological activities such as antibacterial, antiinflammatory and immune-enhancing activities (Toz and Deger 2018). Antioxidant vitamins protect the oxidant-antioxidant balance by using ways such as clearing ROS, repairing tissue damage, and increasing antioxidant capacity. Trace elements take part in vital events such as serving as antioxidants in the body, being a cofactor of various enzymes, balancing membranes, and helping the functions of hormones (Cetin et al. 2020; Bulduk et al. 2022). In previous studies, changes in serum/tissue vitamin and mineral levels due to fluorosis were investigated (Bouaziz et al. 2007; Yasar and Yur 2008; Altug et al. 2013; Comba and Cinar 2016). However, no study was found on the effect of CS and COS on mineral and vitamin levels in fluorosis. Therefore, in this study, the effects of CS and COS on serum mineral (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) and vitamin (retinol, α -tocopherol, vitamin D₃) levels in rats with experimental fluorosis were evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval was registered with the document dated 28.07.2020 and numbered 2020/07-03 of Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Local Ethics Committee.

Sodium fluoride (CAS Number: 7681-49-4), CS (CAS Number: 9012-76-4), COS (CAS Number: 148411-57-8) were obtained from Sigma-Aldrich. This study was carried out in Van Yuzuncu Yil University Experimental Animals Unit, using 42 male Wistar albino rats. During the experiment, rats were housed in rooms with 12 hours of darkness and 12 hours of light and a temperature of 22±2°C.

Experimental Procedure

The study was planned as 12 weeks. 42 male Wistar albino rats were divided into 6 groups, with 7 rats in each group.

Wistar albino rats were eight to ten weeks old, weighing 150 to 200 g. The control group received normal drinking water. Drinking water of the fluorosis group (F) and fluorosis-induced experimental groups were given as 100 ppm sodium fluoride water (Zhang et al. 2014). Fluorosis and CS group (F-CS), CS group, fluorosis and COS group (F-COS) and COS groups were formed. CS (Pan et al. 2016) and COS (Zong et al. 2012) were administered orally at 250 mg/kg/day, the studies continued for an average of four weeks. At the end of the experiment, the rats were placed in the dorsoventral position after ketamine HCl (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (i.p) administration. The hearts of the rats were directly cannulated and blood samples were taken into vacuum tubes. In tubes without anticoagulant, the blood was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. After the serums were separated, they were kept at -18 °C temperature until analysis.

Biochemical Analysis

Fe and Mn analysis of the serum obtained from the blood in the study were measured using atomic absorption spectrometry (AAS, Thermo Scientific, IEC 3000 Series). Cu, Zn, Se analysis were performed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo Scientific, ICAP3000 Series) and vitamin (retinol, α -tocopherol, D₃) analyzes using high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1100 Series) device.

Statistical Analysis

After the test for the data of the groups, it was seen that they had a normal distribution. One-way Analysis of Variance (ANOVA) was used to compare the data, and Duncan's test was used for multiple comparisons between groups. Data were presented as mean \pm standard deviation (SD). A P value of 0.05 was accepted as the statistical significance level in the calculations. All analyzes were performed using the SPSS (23.0) package program.

RESULTS

Serum Cu, Zn, Mn and Se levels were decreased in the F group compared to the control group. Compared to the F group, there was a non-significant increase in Cu and Se levels in the F+CS group, but an important increase in the F+COS. The difference in Cu and Se levels was insignificant between the F+CS and F+COS groups. There was a significant increase in Cu level in the CS and COS groups compared to the control group. Serum Zn levels were found to be significantly decreased in Group F. When compared with the control and F groups, it was determined that the Zn level increased significantly in the CS, COS, F+CS and F+COS groups.

It was found that serum Mn levels were significantly decreased in the F and F+CS groups compared to the control group. It was determined that there was no difference in Mn levels between all CS and COS applied groups and F group. Retinol levels were found to be decreased in the F, CS, F+CS and F+COS groups compared to the control group. There was no significant difference between control and COS groups retinol levels. Compared to the control group, α -tocopherol levels were found to be significantly lower in all F-treated groups and in the CS group. There was an increase in α -tocopherol level in the F+COS group compared to the F group. It was determined that there was a similarity between the control group and the COS group in α -tocopherol levels. It was determined that there was no significant difference in serum Fe and vitamin D levels in all groups.

Table 1. Serum trace mineral and vitamin levels of control and experimental groups.

| Parameter (ppm) | C (n=7) | F (n=7) | F+CS (n=7) | F+COS (n=7) | CS (n=7) | COS (n=7) |
|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Cu | 1.34±0.12 ^b | 1.13±0.06 ^d | 1.16±0.21 ^{c,d} | 1.30±0.14 ^{b,c} | 1.52±0.14 ^a | 1.58±0.04 ^a |
| Zn | 1.36±0.02 ^b | 1.14±0.03 ^c | 1.84±0.14 ^a | 1.71±0.15 ^a | 1.77±0.07 ^a | 1.88±0.19 ^a |
| Mn | 0.55±0.02 ^a | 0.41±0.03 ^b | 0.42±0.03 ^b | 0.43±0.02 ^{a,b} | 0.45±0.05 ^{a,b} | 0.47±0.07 ^{a,b} |
| Fe | 3.38±1.43 | 2.37±0.19 | 2.84±0.37 | 2.76±0.67 | 2.72±0.36 | 3.26±0.30 |
| Se | 1.11±0.07 ^a | 0.91±0.02 ^c | 0.99±0.03 ^{b,c} | 1.05±0.04 ^{a,b} | 1.07±0.11 ^a | 1.12±0.03 ^a |
| Retinol | 0.23±0.01 ^a | 0.16±0.03 ^b | 0.16±0.02 ^b | 0.16±0.01 ^b | 0.16±0.02 ^b | 0.20±0.03 ^a |
| α-Toc | 2.20±0.08 ^a | 0.24±0.08 ^d | 0.78±0.56 ^{c,d} | 1.00±0.34 ^c | 1.20±0.30 ^{b,c} | 1.72±0.63 ^{a,b} |
| Vit D | 0.27±0.07 | 0.19±0.06 | 0.24±0.02 | 0.27±0.10 | 0.27±0.05 | 0.27±0.03 |

Values are expressed as Mean ± SD, different letters in the same line show statistical significance ($p < 0.05$). C: control group, F: fluorosis group, F+CS: fluorosis and chitosan group, F+COS: fluorosis and chitosan oligosaccharide group, COS: chitosan oligosaccharide group, CS: chitosan group. α-Toc: α-tocopherol, Vit D: Vitamin D. One-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used to compare the values of the groups, and Duncan's test was used for multiple comparisons between groups.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Although fluorine is considered an important trace element considering its role in stabilizing teeth and bones, it is known that high fluoride intake (>1 ppm) causes toxic effects. Fluoride toxicity is known to affect teeth and bones. However, it has harmful effects on the liver and kidneys as well as other tissues and organs (Tkachenko et al. 2021; Çetin et al. 2019). Studies by many researchers have shown that oxygen radical formation and lipid peroxidation are among the harmful effects of chronic fluorosis (Chlubek and Poland 2003; Yur et al. 2013; Komuroglu et al. 2022). It has been reported that the use of antioxidants and antioxidant-rich foods can act as an antidote in the treatment of fluorosis in the prevention of oxidative stress-induced lipid peroxidation (Samal et al. 2016; Mesram et al. 2017). Chitin is a biopolymer found in the skeleton of insects such as crab shrimp and in the fungi. CS and COS, known as prebiotics, are obtained by enzymatic or chemical hydrolysis of chitin. CS and its derivatives have been the subject of research due to their abundance in nature, non-toxicity and antioxidant activities. It has been stated that CS and CS derivatives show antioxidant properties due to active hydroxyl and amine groups. It has been reported that CS and its derivatives, those with low molecular weight and the broken forms of intermolecular hydrogen bonds, will have more antioxidant properties (Xie et al. 2001). Trace minerals are elements that are required at the micro level as part of daily diets. Trace elements are essential for metabolic functions. Fe for CAT, Se for GSH-Px, Cu, Zn and Mn elements for SOD act as cofactors. In the case of a decrease in these elements, deterioration in the antioxidant mechanism is observed (Ersoy et al. 2011; Tkachenko et al. 2021). Trace element concentration in body fluids and tissues varies depending on disease state, gastrointestinal tract absorption, food intake, age and gender (Underwood 2012).

Vitamins are organic compounds that the body needs in trace amounts in order to maintain growth, development and health in living organisms. Vitamins show these effects, which are important for the organism, in the form of direct or indirect participation in many biochemical and physiological events in metabolism. In addition, it is reported that vitamins play a role in the execution of functions such as prophylaxis of diseases, treatment of acute diseases, protection of cancer and coronary diseases

(Champe et al. 2005). There are some studies on vitamin levels and trace element in experimental fluorosis. In this study, the effects of CS and COS on serum trace mineral (Cu, Zn, Se, Mn, Fe) and vitamin (retinol, α-tocopherol, D₃) levels in experimentally fluorosis induced rats were investigated. It has been determined that there are changes in serum mineral levels in human (Tkachenko et al. 2021; Ersoy et al. 2011; Pei-zhong, Zhong-jie, and Tao 2002; Meral et al. 2004; Chen et al. 2002; Meral et al. 2004; Ersoy et al. 2011; Tkachenko et al. 2021) and animal (Kahl et al. 1973; Donald et al. 1979; Kessabi et al. 1983; Maraşlı et al. 1995; Singh and Swarup 1999; Tao et al. 2005; Tao et al. 2006; Kant et al. 2009; Altug et al. 2013) studies in fluorosis. Different results have been reported regarding mineral levels in natural or experimental fluorosis studies in animal species. In this study, decreased serum Cu levels in rats with experimental fluorosis were similar to those reported in sheep (Maraşlı et al. 1995), goats (Altug et al. 2013), cattle (Singh and Swarup 1999; Czerny et al. 2000; Samal et al. 2016), pigs (Tao et al. 2005) and humans (Chen et al. 2002; Meral et al. 2004; Ersoy et al. 2011; Tkachenko et al. 2021) with fluorosis. In our study, a significant decrease was found in the Zn level as well as in the Cu level. This result is inconsistent with some studies stating that the difference in Zn levels between the control and fluorosis groups were similar (Altug et al. 2013; Maraşlı et al. 1995), but it is consistent with the results other than these studies. Cu plays a vital role in lipid metabolism in humans and animals (Samal et al. 2016). Plasma Cu and cholesterol concentrations are opposite to each other. In our previous research with the animals used in this study, we found that the serum cholesterol level increased significantly (Özdek et al. 2020). As Czerny et al. (2000) stated, this increase in cholesterol level may have caused a decrease in Cu level. The fact that the change in Fe level was not statistically significant in our study is consistent with the study result of Tkachenko et al. (2021). However, it does not match data from studies that found significant decreases (Altug et al. 2013; Samal et al. 2016) and rises (Chen et al. 2002) in Fe levels. Fluorine increases the absorption and utilization of Fe (Tao et al. 2005). A study of rats treated with fluoride showed a reduction in blood Fe with a concomitant increase in bone marrow and liver Fe uptake (Kahl et al. 1973). Also, Tao et al. (2005) found decreased Fe content in serum, spleen, liver, kidney and bone of rabbits treated with fluoride. It has been suggested that excessive fluoride

intake impairs Mn metabolism (Singh 1982). It has been shown that the amount of serum Mn is decreased in pigs (Tao et al. 2005), humans (Meral et al. 2004) and goats (Altug et al. 2013) and increase in cattle (Singh and Swarup 1999). Tkachenko et al. (2021) found that the decrease in Mn level in humans was not significant.

In this study, in agreement with the literature mentioned above, the amount of serum Mn was significantly reduced in rats with fluorosis (Altug et al. 2013; Tao et al. 2005; Meral et al. 2004). Decreased serum Mn level in this study, as suggested in the previous study (Li, Tan, and Zhang 1990), may be due to the formation of insoluble structures in the digestive system due to the decrease in absorption of Mn in the body. There is little literature on the effects of fluoride on serum Se levels. In our study, we found that serum Se amount were decreased in rats with fluorosis. Similarly, Tkachenko et al. (2021) found that there was a decrease in serum Se amounts at children with endemic fluorosis. Se is a necessary cofactor for the activity of several enzymes involved in the antioxidant system. Se is an essential component of GSH-Px. Se increases fluoride excretion in rats with fluorosis and is involved in the regulation and recovery of free radicals and lipid metabolism disorders. Se can help reduce high fluoride levels. Hence, it can protect the skeleton against fluoride toxicity. The curative effect of Se is related to its role in various physiological functions, in addition to its biologically active antioxidant role. Reddi et al. (2009) showed that Se can have a positive effect against fluoride exposure. Studies in children with chronic fluorosis have reported that decreases in blood GSH-Px activity are due to low levels of Se (Tkachenko et al. 2021; Tkachenko and Skaletska 2009). Fluorine, a highly electronegative halogen, has high affinity for the electropositive element. In our study, the reduction of fluorine by forming complexes with trace minerals such as Cu, Zn and Mn in the gastrointestinal tract or the protective roles of these minerals from oxidative stress by formation of free radicals may be due to the decrease in serum levels of these minerals. In our previous research, it was revealed that fluorosis caused deterioration in antioxidant defense by increasing oxidative stress in the liver of rats (Ozdek et al. 2021). The decrease in blood Cu, Zn and Mn levels may have been effective in the decrease in SOD, the decrease in Fe level CAT and the decrease in Se level may have been effective in the decrease in GSH-Px enzyme activity. Vitamins play an important role in maintaining the oxidant antioxidant balance. Studies on vitamin levels regarding fluoride exposure are both scarce and conflicting. Apart from its protective effect on lipid peroxidation, vitamin E also has regulatory effects on humoral and cell-mediated immunity (Altuner et al. 2017). High α -tocopherol levels in serum have been detected in guinea pigs (Vatassery, et al. 1980) and goats (Altug et al. 2013) in chronic fluorosis. In the study conducted at sheep with fluorosis, no significant change was found in vitamin E levels (Yasar and Yur 2008). In this study, a significant decrease was observed in serum α -tocopherol levels in rats with fluorosis, unlike the literature above.

Lipid peroxidation and oxidative stress are effective in the pathogenesis of fluorosis. This decrease in serum α -tocopherol level may be related to the increase in oxidative stress and lipid peroxidation. In this study, it was determined that the amount of retinol in the serum decreased significantly in rats with fluorosis. It has been stated that serum β -carotene and vitamin A levels are low in sheep with fluorosis, which is due to oxidative stress caused by inadequate food intake and high fluorine levels (Yasar and Yur 2008). In a study conducted in animals with

fluorosis, it was stated that the level of vitamin A changed due to reasons such as feeding season, amount of feeding and food supplementation, while the level of retinol did not change. Vitamin D provides the mineral (Ca, P) balance in the body and is an important biomolecule for muscle, bone health and immune system. Studies conducted in goats with fluorosis (Altug et al. 2013) and pigs with experimental fluorosis (Andersen et al. 1986) have determined that serum vitamin D is at a level that facilitates the absorption of Ca absorption during digestion. As in the literature above, the differences in serum vitamin D levels in fluorosis were insignificant in this study. The physicochemical properties, molecular weights and deacetylation degrees of CS and its derivatives determine. CS and its derivatives with low viscosity and good solubility were preferred more in the studies. Their molecular weights are low (Laokuldilok et al. 2017). Derived from CS by chemical and enzymatic hydrolysis, the COS form is more soluble than the main component. COS reduces the level of cholesterol and the number of pathogenic bacteria in the intestinal tract. It strengthens the immune system and has anticarcinogenic, antioxidant and antidiabetic effects (Leblebici and Aydogan 2018). Studies of liver toxicity with carbon tetrachloride (CCl₄) have shown that CS (Ramasamy et al. 2014) and COS (Yan et al. 2006) have significant antioxidant effects. In the study in which lead poisoning was created, it was determined that the amount of protein oxidation in the blood increased, the amount of reduced glutathione and total thiol decreased. However, with the application of CS and its derivatives, it was determined that lead was removed from the blood and there were different degrees of improvement in biochemical parameters. As a result, it has been stated that CS and its derivatives are beneficial for mitigating lead-induced oxidation damage in vivo (Wang et al. 2016). In a study on lead poisoning, it was stated that CS was effective in removing lead from the circulation and therefore strengthened the antioxidant defense system in erythrocytes and prevented oxidative damage (Toz and Deger 2018). In this study, it was shown that the amount of serum Cu and Zn increased in the groups as a result of the application of CS and COS, but the changes in Se, Fe and Mn levels were not statistically significant. Leblebici and Aydogan (2018) support our result by detecting an increase in plasma Cu amounts and an insignificant increase in Zn levels in chicks treated with COS. This supports the hypothesis that prebiotics positively affect mineral absorption. Because indigestible carbohydrates facilitate the transfer of water to the large intestine, prebiotics can increase mineral absorption in the cecum, thus increasing the volume of fluid in which the minerals can dissolve. It also increases the absorption of ionized minerals by reducing cecum pH and fermentation (Roberfroid 2000). In our study, it was determined that the Zn levels in the F+CS group, and the Cu, Zn and Se levels in the F+COS group increased significantly compared to the F group, and there was no significant difference in the Fe and Mn levels. In a study, it was found that although chitosans with different molecular weights and degrees of deacetylation did not have a significant effect on Fe, Zn and Cu levels in the liver, spleen, heart and kidneys of mice, medium molecular weight CS significantly increased Fe, Zn and Cu levels in the liver (Zeng et al. 2008). In a study in which chitin and CS were applied, it was stated that both chitin and CS were increased to 10% and 20% levels in the diet, and Fe absorption was suppressed in animals consuming 10% CS. In addition, it was determined that there was a positive balance for P, Ca, Mg, Zn and Cu. It has been stated that the inability of rats to use Fe in the diet and the body's loss of Fe is due to the inflammatory state of the small intestine

caused by CS and, to a lesser extent, chitin (Gordon and Williford 1983). The significant and/or insignificant decreases in the levels of fat-soluble vitamins in the groups treated with CS and COS may be due to the inhibitory effects of these substances on lipid absorption in the intestines. It has been stated that COS has an undesirable effect by causing a significant decrease in plasma vitamin E level (Koide 1998). It has been reported that the long-term addition of CS to the diet in rats with polyhypovitaminosis may cause fat-soluble vitamin deficiencies (Vrzhesinskaia et al. 2011). In conclusion, our findings showed that there was a significant decrease in serum Cu, Zn, Se, retinol and α -tocopherol levels in rats with fluorosis, and COS was more effective than CS against the decrease in mineral and vitamin levels.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

Ethical approval was registered with the document dated 28.07.2020 and numbered 2020/07-03 of Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Local Ethics Committee.

This study was financially supported by the Research Fund of the Van Yuzuncu Yil University under grant [number THD-2020-9293].

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: YD, UÖ

Supervision / Consultancy: YD

Data Collection and / or Processing: YD, UÖ

Analysis and / or Interpretation: İHY, UÖ

Writing the Article: YD, UÖ

Critical Review: YD, UÖ, İHY

REFERENCES

- Altner A, Atalay H and Bilal T (2017). Vitamin E as an Antioxidant. *BAUN Sağ Bil Derg*, 6 (3), 149-57.
- Altug N, Arslan S, Yuksek N et al. (2013). The levels of trace elements and selected vitamins in goats with chronic fluorosis. *Turk J Vet Anim Sci*, 37 (5), 529-34.
- Andersen L, Richards A, Care A et al. (1986). Parathyroid glands, calcium, and vitamin D in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int*, 38 (4), 222-26.
- Bouaziz H, Croute F, Boudawara T, Soleilhavoup JP, Zeghal N (2007). Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Exp Toxicol Pathol*, 58 (5), 339-49.
- Bulduk B, Gokhan O, Gunbatar N et al. (2022). The effect of resveratrol on toxicity caused by cisplatin in rats with experimentally created diabetes by streptozotocin. *JHSM*, 5 (1), 124-30.
- Bulduk B, Uyar H, Oto G et al. (2022). Effect of Exposure to Fluorine and 7, 12-Dimethyl Benzantracene on Vascular Responses. *FEB*, 31 (3), 2826-31.
- Cetin S, Deger Y, Dede S, Yur F (2020). The concentration of certain trace elements in the wool of sheep with fluorosis. *Fluoride*, 53 (1 Pt 2), 164-69.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2005). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Comba B, Cinar A. (2016). Investigation of effects of fluorosis on some minerals and hormones in sheep. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 63 (3), 223-27.
- Cetin S, Yur F, Taspınar M, Yuksek V (2019). The effects of some minerals on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-administered renal and osteoblast cell lines. *Fluoride*, 52 (3), 362-78.
- Ersoy İH, Koroglu BK, Varol S et al. (2011). Serum copper, zinc, and magnesium levels in patients with chronic fluorosis. *Biol Trace Elem Res*, 143 (2), 619-24.
- Gordon DT, Williford CB (1983). *Chitin and chitosan: Influence on element absorption in rats*. ACS Publications. Columbia.
- Kahl S, Wójcik K, Ewy Z (1973). Effect of fluoride on some hematological indices and 59Fe distribution in the blood and iron-storing tissues in rats. *Bull Acad Pol Sci Biol*, 21 (5), 389-93.
- Koide S (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr Res*, 18 (6), 1091-101.
- Komuroglu AU, Seckin H, Ertas M, Meydan I (2022). Metagenomic Analysis of Intestinal Microbiota in Fluorated Rats. *Biol Trace Elem Res*, 300, 3275-83.
- Laokuldilok T, Potivas T, Kanha N et al. (2017). Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. *Food Biosci*, 18, 28-33.
- Leblebiciyer ODY, Aydoğan İ (2018). The Effects of Mannan Oligosaccharide and Chitosan Oligosaccharide on Performance and Blood Parameters of Broilers. *JPR*, 15 (1), 18-22.
- Li C, Tan Y, Zhang L (1990). The recognition of fluorosis as a chemical question through trace element analysis of the liver and spleen of the monkey. *Endemic Dis Bull*, 5, 1-5.
- Meral I, Demir H, Gunduz H, Mert N, Dogan I (2004). Serum copper, zinc, manganese, and magnesium status of subjects with chronic fluorosis. *Fluoride*, 37 (2), 102-106.
- Mesram N, Nagapuri K, Banala RR, Nalagoni CR, Karnati PR (2017). Quercetin treatment against NaF induced oxidative stress related neuronal and learning changes in developing rats. *J King Saud Univ Sci*, 29 (2), 221-29.
- Ozdek U, Komuroglu AU, Oguz AR, Deger Y (2021). Protective effects of chitosan and chitosan oligosaccharide against oxidative damage in liver tissue of rats with fluorine poisoning. *PJPS*, 34 (1), 373-79.
- Pan H, Yang Q, Huang G et al. (2016). Hypolipidemic effects of chitosan and its derivatives in hyperlipidemic rats induced by a high-fat diet. *Food Nutr Res*, 60 (1), 31137.
- Pei-zhong C, Zhong-jie Y, Tao L (2002). Relations between endemic fluorosis and chemical elements in environment. *CJPH*, 18 (4), 433-34.
- Ramasamy P, Subhpradha N, Shanmugam V, Shanmugam A (2014). Protective effect of chitosan from *Sepia kobsiensis* (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl4 induced hepatic injury. *Int J Biol Macromol*, 65, 559-63.
- Reddy GB, Khandare AL, Reddy PY et al. (2003). Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. *Toxicol. Sci*, 72 (2), 363-68.
- Roberfroid MB (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*, 71 (6), 1682S-87S.
- Samal P, Patra R, Gupta A et al. (2016). Effect of Tamarindus indica leaf powder on plasma concentrations of copper, zinc, and iron in fluorotic cows. *Vet World*, 9 (10), 1121.
- Singh J, Swarup D (1999). Biochemical changes in serum and urine in bovine fluorosis. *Indian J Anim Sci*, 69 776-78.
- Singh M (1982). Effect of fluoride on tissue manganese levels in the mouse. *Sci Total Environ*, 22 (3), 285-88.
- Tao X, Xu Z and Wang Y (2005). Effect of excessive dietary fluoride on nutrient digestibility and retention of iron, copper, zinc, and manganese in growing pigs. *Biol Trace Elem Res*, 107 (2), 141-51.
- Tkachenko H, Kurhaluk N, Skaletska N, Maksin V, Osadowski Z (2021). Elemental status and lipid peroxidation in the blood of children with endemic fluorosis. *Biol Trace Elem Res*, 199 (4), 1237-45.
- Tkachenko H, Skaletska N (2009). The state of the prooxidant and antioxidant system in the blood of children living in an environmentally disadvantaged region. *J Environ Health*, 23.
- Toz H, Deger Y (2018). The effect of chitosan on the erythrocyte antioxidant potential of lead toxicity-induced rats. *Biol Trace Elem Res*, 184 (1), 114-18.
- Underwood E (2012). *Trace elements in human and animal nutrition*. Elsevier, London.
- Varol E, Varol S (2010). Fluorosis as an Environmental Disease and its Effect on Human Health. *TAF Prev Med Bull*, 9 (3), 233-38.
- Vatassery G, Ophaug R, Singer L (1980). The effect of fluoride intake on the total lipid, cholesterol and vitamin E levels in a sera and liver of guinea pigs on high fat diet. *Life Sci*, 27 (21), 1961-66.
- Vrzhesinskaia OA, Kodentsova VM, Beketova NA, Kosheleva OV, Pereverzeva OG (2011). The effect of various levels of chitosan in rat diet on vitamins assimilation under their combined deficiency. *Vopr Pitan*, 80 (4), 56-61.
- Wang Z, Yan Y, Yu X et al. (2016). Protective effects of chitosan and its water-soluble derivatives against lead-induced oxidative stress in mice. *Int J Biol Macromol*, 83, 442-49.
- Xie W, Xu P, Liu Q (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 11 (13), 1699-701.

- Yan Y, Wanshun L, Baoqin H, Bing L, Chenwei F (2006).** Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Hepatol Res*, 35 (3), 178-84.
- Yasar S, Yur F (2008).** Antioxidant vitamin and mineral levels in sheep with fluorosis. *Biol Trace Elem Res*, 123 (1), 139-43.
- Yur F, Mert N, Dede S et al. (2013).** Evaluation of serum lipoprotein and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride*, 46 (2), 90-96.
- Zeng L, Qin C, He G et al. (2008).** Effect of dietary chitosans on trace iron, copper and zinc in mice. *Carbohydr Polym*, 74 (2), 279-82.
- Zhang Z, Zhou B, Wang H et al. (2014).** Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *Int J Environ Res*, 11 (1), 1020-33.
- Zong C, Yu Y, Song G et al. (2012).** Chitosan oligosaccharides promote reverse cholesterol transport and expression of scavenger receptor BI and CYP7A1 in mice. *Exp Biol*, 237 (2), 194-200.



Broiler Tavuklarda ve Japon Bildircinlarında Karaciğer Bağ Doku Liflerinin Histolojik Olarak İncelenmesi

Füsün ERHAN BAYÇUMENDUR^{1,*} Levent ERGÜN²

¹ Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology-Embryology, 58140, Sivas, Turkey.

² Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology-Embryology, 06110, Ankara, Turkey.

Received: 19.08.2022

Accepted: 16.11.2022

ÖZ

Organizmadaki en yaygın doku türü olan bağ dokusunu oluşturan unsurlar arasında bağ doku lifleri vardır. Bunlar kolajen lifler, retiküler lifler ve elastik liflerdir. Yaşam için temel organlardan biri olan karaciğer, vücudun en büyük bezidir ve bağ doku organın çatısını oluşturmaktadır. Karaciğerin bağ dokusu hastalıklarından etkilenen bir organ olduğu düşünüldüğünde organın çatısını oluşturan bağ doku daha fazla önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Japon bildircini ile Broiler tavuk karaciğeri bağ doku liflerinin varlığı ve dağılımını karşılaştırmalı olarak histolojik metotlarla ortaya koymaktır. Çalışmada 6' şar adet erişkin tavuk ve bildircin karaciğer doku örnekleri kullanılmıştır. Karaciğerden alınan doku örneklerine retiküler lifleri göstermek için Gordon Sweet's gümüşleme yöntemi, elastik lifler için Verhoeff's Van Gieson (EVG) ve kolajen lifler için Masson Trichrome boyama tekniği uygulanmıştır. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendikten sonra fotoğrafları çekilerek gruplar arasındaki farklılıklar histolojik olarak değerlendirilmiştir. Tavuk karaciğeri Glisson kapsülünde ve portal aralığa ait oluşumların çevresinde kolajen liflerin daha kuvvetli boyandığı görüldü. Retiküler lifler, tavuk karaciğerindeki hepatositlerin çevresinde, vena sentralis duvarında ve Glisson kapsülünde bildircin karaciğerinden daha yoğun olarak görüldü. Elastik liflerin ise hem bildircin hem de tavuk karaciğerinde benzer yapıda ve oranda olduğu fark edildi.

Anahtar kelimeler: Bağ doku, Bildircin, Karaciğer, Tavuk.

ABSTRACT

Histological Examination of Liver Connective Tissue Fibers in Broiler Chickens and Japanese Quails

Connective tissue fibers are among the elements that make up the connective tissue, which is the most common type of tissue in the organism. The liver, one of the basic organs for life, is the largest gland in the body and connective tissue forms the roof of the organ. Considering that the liver is an organ affected by connective tissue diseases, the connective tissue that forms the roof of the organ gains more importance. The aim of this study is to reveal the presence and distribution of connective tissue fibers in Japanese quail and broiler chicken livers by histological methods. As material, liver tissue samples of 6 adult chickens and 6 quails were used. Gordon Sweet's silver method was applied to show reticular fibers, Verhoeff's Van Gieson for elastic fibers and Masson Trichrome staining technique for collagen fibers were applied to tissue samples taken from liver. After the stained preparations were examined under a light microscope, their photographs were taken and the differences between the groups were evaluated histologically. It was observed that collagen fibers stained more strongly in chicken liver Glisson's capsule and around the formations of the portal space. Reticular fibers were seen more densely in the wall of central vein, between hepatocytes and Glisson's capsule in the chicken liver than in the quail liver. Elastic fibers were found to be similar in structure and proportion in both quail and chicken livers.

Keywords: Chicken, Connective tissue, Liver, Quail.

GİRİŞ

Yaşam için temel organlardan biri olan karaciğer, vücudun en büyük bezidir (Gartner ve Hiatt 2006). Elastik kıvamlı ve kolaylıkla parçalanabilen bir yapıya sahiptir (Junqueira ve Charneiro 2005). Safra salgılama, glikojen, lipid, vitamin ve demir gibi maddeleri depolama, kanı metabolizma

artıklarından ve toksik maddelerden temizleme, fütusta ve yenidoğan dönemde kan yapımı gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (Petorak 1986; Aydın ve ark. 2000). Karaciğerin bu fonksiyonları, organın prenatal ve postnatal dönemdeki morfolojik gelişimi ile birlikte ortaya çıkmaktadır (Şentürk ve Karabıyık 2019). Karaciğerde meydana gelebilecek



herhangi bir fonksiyon bozukluğu vücuttaki tüm sistemleri etkiler (Eşrefoğlu 2004).

Bağ dokusunun liflerini uzun yapılar biçiminde polimerleşmiş proteinler oluşturur.

Organizmadaki en yaygın doku türü olan bağ dokusunu oluşturan unsurlar arasında bağ dokusu lifleri (iplikleri) vardır. Bağ dokusunun şekilli unsurları olan lifler protein yapısındaki uzun peptid zincirlerinden meydana gelirler (Girgin ve ark. 2011). Bağ dokusunun üç ana lif tipi kolajen, retiküler ve elastik liflerdir. Bu lifler farklı tip bağ dokuları arasında eşit olmayan şekilde dağılmıştır (Junqueira ve Charneiro 2005). Kolajen lifler, bağ dokusunun en bol bulunan yapısal bileşenidir ve dokularda lif demetleri şeklindedirler (Ertürkoğlu 2007; Girgin ve ark. 2011). İçerdikleri zincirlerin kombinasyonuna göre en az 27 farklı tipte kolajen sınıflandırılmıştır. Bu kolajenler arasında en yaygın bulunan Tip I, II ve III kolajenlerdir. Kolajen lifler esneme ve yüksek gerilme gücüne sahiptirler. Işık mikroskop altında incelendiğinde dalgalı yapıda olup, belirgin bir uzunluğu ve genişliği yoktur. Her lifin içinde eşit çaplarda kolajen lifler bulunur. Vücudun farklı bölgelerinde ve gelişimin farklı aşamalarında bu liflerin çapı değişir. Histolojik preparatlarda asit boyalarla boyanırlar. Hematoksilin-eozinle pembe, Masson'un üçlü boyamaları ile mavi ya da yeşil renkte görünürler. Kolajen liflerden daha ince olan elastik lifler, dokulara esneklik ve gerilme özelliği kazandırır. Kolajen liflerle beraber örülerek dokunun gerilmesine sınırlama getirir ve aşırı esneyerek yırtılmasını önler. Elastik lifler kolajen içermezler. Gelişim esnasında, organlarda veya bağ dokularında en son ortaya çıkan lif elastik lifdir. Karaciğer kapsülünde ve portal alanlarda bulunan ince elastik lifler Orsein ve Rezorsin-fuksin ile boyandığında seçilebilirler. Işık mikroskopunda homojen görünürler (Girgin ve ark. 2011). Retiküler lifler çok ince fibriller halindedirler ve tip III kolajenden meydana gelirler. Elastik liflere bağlanmazlar fakat kolajen liflere bağlanırlar (Ertürkoğlu 2007). Dallara ayrılıp anastomozlaşarak ağlar oluştururlar. Retiküler lifler ışık mikroskopu incelemelerinde gümüş tuzlarıyla siyaha boyanarak kolayca görülebilirler. Retiküler lif ağları embriyonik dokularda da bulunurlar. Bu liflerin miktarı dokuların olgunluk derecesini gösterir (Girgin ve ark. 2011).

Karaciğer, kollajen ve elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmış Glisson kapsülü ile sarıdır (Karagöz 2002). Karaciğer parankimasına doğru glisson kapsülünden dallar uzanarak organı lop ve lopçuklara (lobüllere) ayırır (Petorak 1986). Böylece karaciğer, ince bağ doku bölmeleri ile lopçuklardan oluşur (Swatland 1994). Ancak kanatlılarda organı saran bu kapsül ve interlobuler septum çok incedir, belirgin bir lopçuk yapısı yoktur. Duvarında Tip I kolajen lifler içeren vena sentralisin bulunduğu her bir ünite, bir lopçuğun karşılığı kabul edilir (Aktümsek 2004; Kaya ve ark. 2017; Taşçı 2018). Bağ dokusu, lopçukların birleştiği yerlerde artış gösterir. Enine kesitlerde üçgen biçiminde seçilen bu alan portal bölge (Glisson üçgeni=Kiernan aralığı)'dir (Eşrefoğlu 2004). Bu bölgede Arteria hepatica, vena interlobularis ve duktus biliferusdan oluşan karaciğer üçlüsü (trias hepatis) bulunur (Rashidi ve Sottile 2009). Bu üçlü yapıdan venülün genellikle duvarı ince, lümeni geniş ve düzensizdir. Arter duvarı venüle göre daha kalın, lümeni küçük ve düzenlidir. Duktus biliferus ise tek katlı kübik epitel ile örtülüdür ve bazal membranlarını oluşturan tip IV kolajeni üretirler (Swatland 1994; Elias 1955). Karaciğerin besleyici damarı olan A. hepatica ve fonksiyonel damarı olan V. porta aracılığıyla karaciğer

lopçuklarına gelen kan sinüzoidlere açılır. Sinüzoidlerle taşınan kan vena sentralis (V. sentralis)'e doğru ilerler (Kaya ve ark. 2017). Kalbe kan taşınmasını sağlayan vena sentralis etrafında, portal alanlara doğru ışınal olarak hepatositler yerleşmiştir (Eşrefoğlu 2004). Lopçuğun merkezinden periferine doğru ilerleyerek birbirleri ile anastomoz yapan sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit kordonları bulunur. Hepatositlerin oluşturduğu bu kordonlar Remark kordonlarıdır. Karaciğer kordon oluşumu, organın kimyasal işlevleri ve metabolizma fonksiyonları için oldukça önemlidir. Sinüzoid duvarı ile hepatositler arasında perisinüzoidal aralık (Disse aralığı) bulunur (Hamburger ve Hamilton 1951; Luzzatto 1981). Karaciğerde hepatositlerin oluşturduğu remark kordonları arasında bulunan sinüzoid duvarının oluşumuna endotel hücrelerinden başka, Kupffer' in yıldız hücreleri, pit hücreleri ve yağ depolayan (Ito) hücreler de katılır (Suksaweang ve ark. 2004). Bu hücre tiplerinin her biri, hepatic fonksiyonları düzenlemek için oldukça önemli işlevlere sahiptirler (Rashidi ve Sottile 2009).

Karaciğer bağ dokusu hastalıklarından 3 şekilde etkilenebilir: sistemik bağ dokusu hastalıklarına bağlı karaciğerin etkilenmesi, otoimmün karaciğer hastalıkları, sistemik bağ dokusu hastalıklarında kullanılan ilaçların karaciğer üzerindeki etkileri (Kaya ve ark. 2017). Karaciğerin bağ dokusu hastalıklarından etkilenen bir organ olduğu düşünüldüğünde organın çatısını oluşturan bağ doku daha fazla önem kazanmaktadır (Ghosh ve Emery 1970; Kaya ve ark. 2017). Bu çalışma, Japon liflerini ile Broiler tavukların karaciğer bağ doku liflerinin varlığı ve dağılımlarının histolojik olarak karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

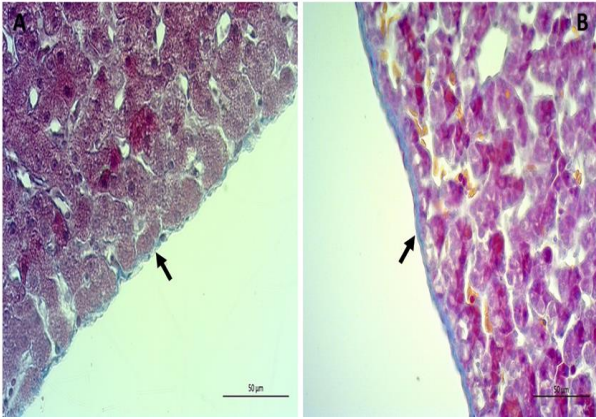
Bu çalışma için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (Sayı:513 Tarih: 22.02.2022).

Çalışmada 6 adet Ross ırkı erişkin Broiler tavuk ile 6 adet erişkin Japon bildircini kullanılmıştır. Tavukların bakım ve beslenmesi yem ve su kısıtlaması yapılmadan temel rasyon verilerek 24 saat aydınlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Erişkin tavuk ve bildircinlerin servikal dislokasyonundan sonra, karaciğerin çeşitli yerlerinden doku örnekleri alınarak tespit işlemi için %10'luk tamponlu formole alınmıştır. Histolojik preparasyon için tespit edilen tavuk karaciğer örnekleri, %10'luk tamponlu formolden %96 alkol, absol alkol, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafin blokta bloklanmıştır. Bloklardan alınacak 5 µm' lik kesitlere retiküler lifleri göstermek için Gordon Sweet's gümüşleme (Sigma- Aldrich lot: HC157186) yöntemi, elastik lifler için Verhoeff' s Van Gieson (Beslab lot: 022022.006) ve kolajen lifler için Masson Trichrome (Beslab lot: 022022.009) boyama tekniği uygulanarak boyanan preparatlar Zeiss Primo Star model ışık mikroskopunda incelenip fotoğrafları çekilerek gruplar arasındaki farklılıklar histolojik olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

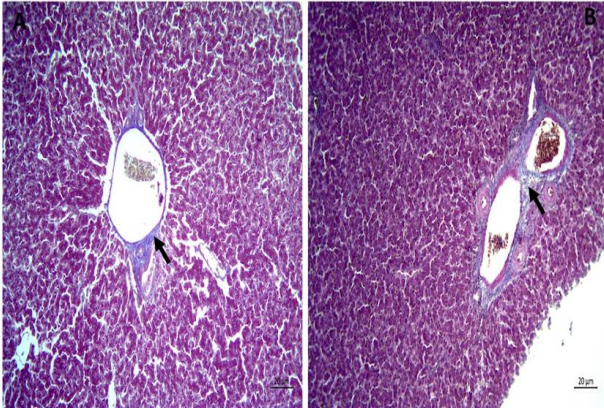
Erişkin bildircin ve tavuklardan alınan karaciğer dokularında, kolajen liflerin varlığını ve dağılımını göstermek amacıyla Masson Trichrome boyama yöntemi uygulandı ve kolajen lifler, koyu mavi renkte ayırt edildi. Kolajen lifler hem bildircin hem tavuk erişkin karaciğer dokusu ile uyumlu olarak, Glisson kapsülünde ve portal alanlarda (Kiernan aralığı) belirgin bir kat halinde gözlemlendi. Fakat tavuklara kıyasla bildircin karaciğerinde daha az miktarda kolajen liflere rastlandı. Ayrıca

bıldırcınlarda bulunan kolajen lif demetleri daha inceydi (Şekil 1, 2, 3).



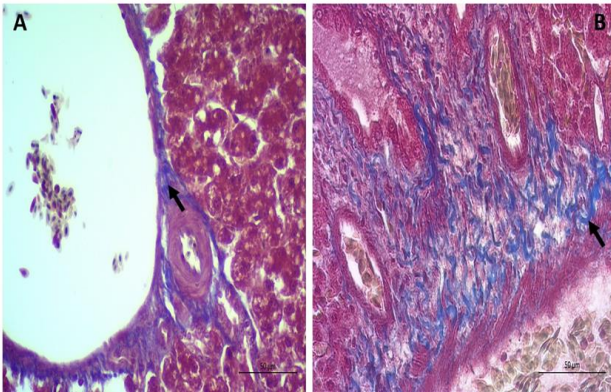
Şekil 1. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Kolajen lifler. Masson Trichrome boyama. Bar: 50 µm.

Figure 1. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: collagen fibers. Masson Trichrome staining. Bar: 50 µm.



Şekil 2. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Kolajen lifler. Masson Trichrome boyama. Bar: 20 µm.

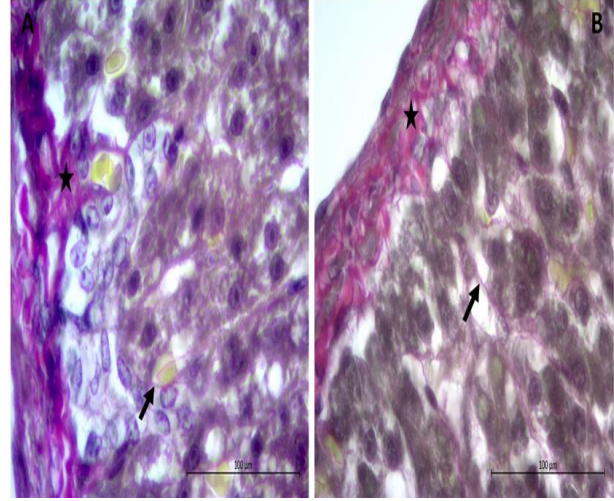
Figure 2. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: collagen fibers. Masson Trichrome staining. Bar: 20 µm.



Şekil 3. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Kolajen lifler. Masson Trichrome boyama. Bar: 50 µm.

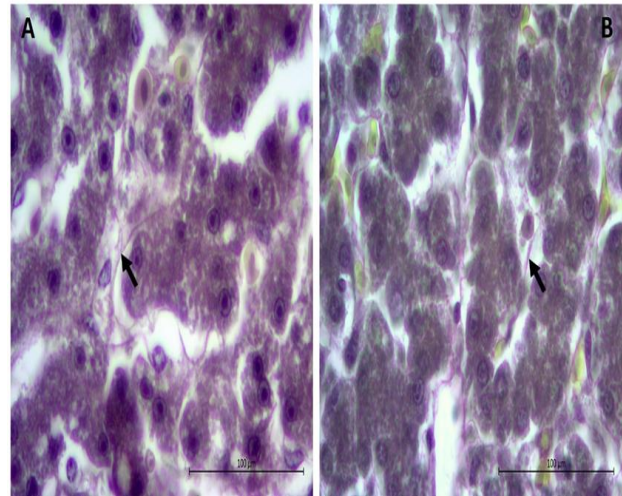
Figure 3. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: collagen fibers. Masson Trichrome staining. Bar: 50 µm.

Elastik lifleri göstermek için uygulanan Verhoeff' s Van Gieson lif boyama yöntemi ile elastik lifler mor, kolajen lifler pembe boyandılar. Erişkin bıldırcın ve tavuk karaciğer kesitleri incelendiğinde, Kiernan aralığında kolajen liflerle örülü şekilde ince elastik lifler görüldü. Parankim hücreleri arasında ince elastik liflere rastlandı (Şekil 4, 5).



Şekil 4. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Elastik lifler. Yıldız: kollajen lifler. Verhoeff' s Elastic Van Gieson boyama. Bar: 100 µm.

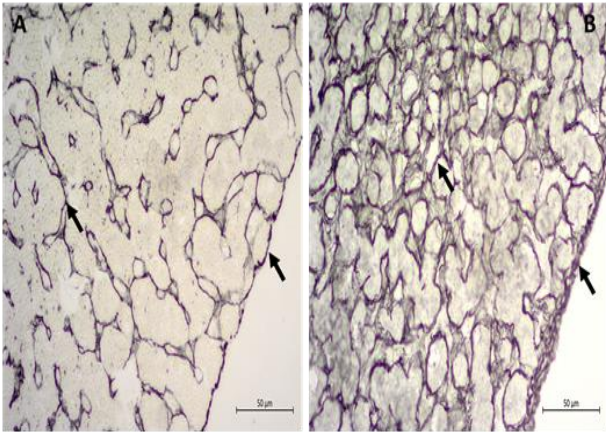
Figure 4. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: elastic fibers. Stars: collagen fibers. Verhoeff' s Elastic Van Gieson staining. Bar: 100 µm.



Şekil 5. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Elastik lifler. Verhoeff' s Elastic Van Gieson boyama. Bar: 100 µm.

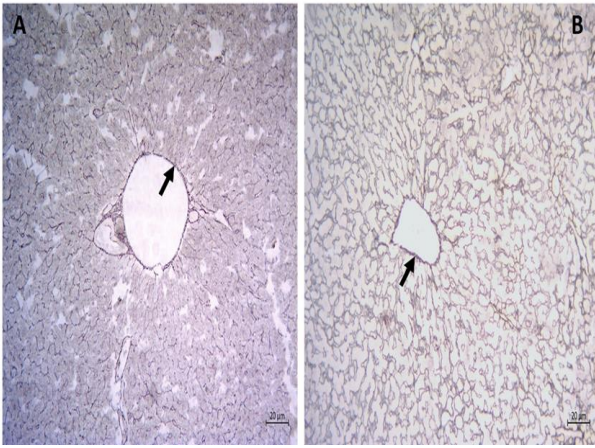
Figure 5. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: elastic fibers. Verhoeff' s Elastic Van Gieson staining. Bar: 100 µm.

Gordon Sweet's gümüşleme yöntemi ile, erişkin bıldırcın ve tavuk karaciğer dokusundaki retiküler (tip-III kolajen lifler) liflerin koyu siyah renkte, Glisson kapsülünde, vena sentralis duvarında, karaciğer parankim hücreleri (hepatositler) arasında birbirleriyle anastomoz yapan üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturdukları görüldü. Erişkin tavuklarda retiküler lifler daha kuvvetli boyandı (Şekil 6, 7).



Şekil 6. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Retiküler lifler. Gordon Sweet's gümüşleme yöntemi. Bar: 50 µm.

Figure 6. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: reticular fibers. Gordon Sweet's silver method. Bar: 50 µm.



Şekil 7. Erişkin bıldırcın (A), erişkin tavuk (B) karaciğer kesitleri. Oklar: Retiküler lifler. Gordon Sweet's gümüşleme yöntemi. Bar: 20 µm.

Figure 7. Liver sections of adult quail (A) and adult chicken (B). Arrows: reticular fibers. Gordon Sweet's silver method. Bar: 20 µm.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğeri dıştan saran Glisson kapsülü kollajen ve elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmıştır (Eşrefoğlu M 2004). Kanatlı hayvanlarda Glisson kapsülü memelilerdekinden daha incedir ve interlobuler septum çok incedir, tipik lopçuk yapısı yoktur. Vena sentralisin bulunduğu her bir ünite bir lopçuğun karşılığı kabul edilir (Swatland 1994; Taşçı 2018). Lopçukların birleştiği yerlerde bağ dokusu artar. Enine kesitlerde üçgen biçiminde seçilen bu alan Kiernan aralığıdır. (Şentürk ve Karabıyık 2019).

Karaciğerin bağ dokusu hastalıklarından etkilenen bir organ olduğu düşünüldüğünde, organın çatısını oluşturan bağ doku daha fazla önem kazanmaktadır. (Kaya ve ark. 2017). Karaciğer, bağ dokusu hastalıklarından temelde 3 şekilde etkilenebilir: sistemik bağ dokusu hastalıklarına bağlı karaciğerin etkilenmesi, otoimmün karaciğer hastalıkları, sistemik bağ dokusu hastalıklarında kullanılan ilaçların karaciğer üzerindeki etkileri.

Rauterberg ve ark. (1981), karaciğerdeki bağ dokusunun parankimal dokuya oranla çok daha az olduğunu ancak organın işleyişini sürdürmesi için oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Normal bir karaciğerdeki, histolojik olarak tanımlanmış bağ dokusunun periportal alanlarda, vena sentralis etrafında ve Glisson kapsülünde bulunduğunu belirterek fibrotik karaciğer ile karşılaştırmaya çalışmışlardır (Rauterberg ve ark. 1981). Japon bıldırcınları ile yapılan bir çalışmada ise (2018), karaciğer kapsülünün elastik ve kolajen lifler içerdiği belirtilmiştir. Kiernan aralığında belirgin bağ doku alanı olduğu bildirilmiştir (Karan ve ark. 2018). Yaptığımız çalışmada bu bulgular ile uyumlu olarak, periportal alanlarda, vena sentralis duvarında ve Glisson kapsülünde kolajen liflere rastlanılmıştır. Broiler tavuklarla yapılan başka çalışmada, Glisson kapsülünde ve loblar arasında bağ dokunun bulunduğunu göstermişlerdir. Fakat bağ doku liflerinin çeşidini belirlemek için ilgili histolojik boyamalar yapılmamıştır. Sadece bağ dokunun (kolajen lifler) varlığını gösteren temel histolojik boyama yöntemini kullanmışlardır (Tarek ve ark. 2019). Yaptığımız çalışmada, bağ doku liflerini birbirinden ayırt etmemizi sağlayan üç ayrı histolojik boyama kullanılmıştır. Erişkin bıldırcın ve tavuk karaciğer kapsülünde ve loblar arasında kolajen liflerden başka elastik lifler de görülmüştür. Boyamalar sonucunda, kolajen, elastik ve retiküler lifler arasında en çok kolajen liflere rastlanılmıştır. Bıldırcın karaciğerini erişkin tavuk karaciğeri ile karşılaştırdığımız zaman ise bıldırcın karaciğerinde kolajen liflerin daha az ve ince yapıda olduğunu gözlemledik. Erişkin bıldırcın ve tavuklardaki elastik lifler, benzer oranda ve yapıda görüldüler. Kolajen liflerden farklı olarak, parankim hücreleri arasında da elastik lifler bulunmaktaydı. Erişkin bıldırcın ve tavuk karaciğer dokusundaki retiküler liflerin koyu siyah renkte, vena sentralis duvarında, karaciğer parankim hücreleri arasında ve Glisson kapsülünde birbirleriyle ağ yapısı oluşturdıkları görüldü. Fakat erişkin tavuklarda retiküler lifler daha kuvvetli boyandı.

Bağ doku tiplerini, miktarını ve dağılımını belirlemek karaciğer histopatolojisiyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda hastalığın tanısı için oldukça önemlidir. Örneğin hücre dışı matriksteki morfolojik değişikliklerin yorumlanmasına dayalı olarak yapılan bir çalışmada, akut ve kronik karaciğer hasarı arasındaki histolojik ayrımı yapabilmek için kollajen tipini ve elastik liflerdeki değişiklikleri belirlemeye çalışmışlardır (Hall ve ark. 2021). Yapılan başka çalışmalarda, karaciğer sirozunun karakteristik özelliğinin kolajen lif miktarının artmasıyla birlikte bağ dokunun birikim gösterdiği bildirilmiştir (Kanta 2016). Karaciğer bağ doku liflerinin histoloji yapısının bilinmesi, karaciğer bağ doku hastalıklarının alta yatan nedenlerinin anlaşılması ve tedaviye yardımcı olması açısından klinik olarak oldukça önemlidir (Youssef ve Tavill 2002). Bu bilgiler dikkate alındığında, yaptığımız çalışmanın farklı alanlardaki araştırmacılar için de temel histolojik veriler sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Kanatlı türlerinin sindirim sistemi organları ile ilgili detayların bilinmesinin söz konusu türlerin verimliliğini artıracak gibi sindirim sistemi hastalıklarının tedavisine de önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Karaciğer; canlıların büyümesini ve verimliliğini düzenleyen, vücut için oldukça önemli biyokimyasal olaylarda görev alan hem metabolik hem de inflamatuvar olaylardan etkilenen bir organdır. Dolayısıyla bağ dokusu hastalıklarından etkilenmemesi düşünülemez. Bu bağlamda düşünülecek olursa organın çatısını oluşturan bağ doku elemanlarının karşılaştırmalı olarak ele alınması

temel bilgiler düzeyinde elde edilebilecek bulguların bilimsel birikime katkısı oldukça önemli olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "V-2021-118" nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışmaya finansal destek veren Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimizi sunarız.

Bu çalışma için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (Sayı:513 Tarih: 22.02.2022).

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: FEB, LE
Denetleme/Danışmanlık: LE
Veri Toplama ve/veya İşleme: FEB
Analiz ve/veya Yorum: FEB, LE
Makalenin Yazımı: FEB
Eleştirel İnceleme: LE

KAYNAKLAR

- Aktümsek A (2004).** Anatomi ve Fizioloji. 2. Baskı. Nobel Yayınları, İstanbul.
- Aydın S, Tekelioğlu Y, Odacı E, Arvas A, Arvas H (2000).** İnsan fetus karaciğerinin ışık mikroskopik ve akım sitometrik incelenmesi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 20 (2), 57-65.
- Elias H (1955).** Origin and early development of the liver in various vertebrates. *Acta Hepatologica*, 31: 1-56.
- Ertürkoğlu ŞA (2007).** Bağ ve Destek Dokusu. Seçkin İ (Ed). Genel Histoloji (pp.47-65). Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları.
- Eşrefoğlu M (2004).** Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Tıp Teknik Yayıncılık, Ankara.

- Gartner LP, Hiatt JL (2006).** Digestive system: Glands. Color Textbook of Histology- e book (pp. 413-436). 3rd Edition. Elsevier health sciences, Philadelphia.
- Ghosh ML, Emery JL (1970).** The connective tissue in livers of children. *J Clin Pathol*, 23 (7), 599-603.
- Girgin A, Liman N, Özfiliz N et al. (2011).** Temel Histoloji. 3. Baskı. Dora Yayıncılık, Bursa.
- Hall A, Cotoi C, Luong TV et al. (2021).** Collagen and elastic fibres in acute and chronic liver injury. *Sci Rep*, 11 (1), 1-12.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951).** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88 (1), 49-92.
- Junqueira LC, Carneiro J (2005).** Basic Histology text&atlas. 11nd Edition. The McGraw-Hill Companies.
- Kanta J (2016).** Elastin in the liver. *Front Physiol*, 7, 491.
- Karagöz E (2002).** Özel Histoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları.
- Karan M, Baygeldi SB, Özkan ZE et al. (2018).** Japon Bildircinlarında (*Coturnix coturnix japonica*) Karaciğerin Morfolojik Yapısının İncelenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 32 (3), 209-212.
- Kaya FÖ, Sezgin G, Nalbant S (2017).** Bağ dokusu hastalıkları ve karaciğer. *Maltepe Tıp Derg*, 9 (2), 38-41.
- Luzzatto AC (1981).** Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat. *Cell Tissue Res*, 215 (1), 133-142.
- Petorak I (1986).** İnsan Embriyolojisinin Ana Hatları. Beta Basım Yayıncılık, İstanbul.
- Rashidi H, Sottile V (2009).** The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays*, 31 (4), 459-465.
- Rauterberg J, Voss B, Pott G, Gerlach U (1981).** Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. *Klin Wochenschr*, 59 (14), 767-779.
- Suksaweang S, Lin CM, Jiang TX, Hughes MW, Widelitz RB, Chuong CM (2004).** Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of β -catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol*, 266 (1), 109-122.
- Swatland HJ (1994).** Structure and development of meat animals and poultry. Technomic publishing Co., Inc, Lancaster.
- Şentürk M, Karabıyık TN (2019).** Hepatektomi ve Karaciğer Rejenerasyonu. Rating Academy Ar-Ge Yazılım Yayıncılık Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon Ticaret Limited Şirketi, Çanakkale.
- Tarek K, Amine B, Eddine RD, Abdelhafidh M, Hanane A (2019).** Morpho-histological comparisons of liver between the broiler chickens and wild boar in Algeria *Adv Anim Vet Sci*, 7 (1), 24-29.
- Taşçı SK (2018).** Sindirim Sistemi-I, Sindirim Sistemi-II. Aslan Ş (Ed). Kanatlı Histolojisi (pp.45-69). 1. Baskı. Dora Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Bursa.
- Youssef WI, Tavill AS (2002).** Connective tissue diseases and the liver. *J Clin Gastroenterol*, 35 (4), 345-349.



Hakkâri İlindeki Küçükbaş Hayvancılık İşletmelerinin Mevcut Durumu ve Genel Sorunları

Yusuf DEMİR¹ Selçuk Seçkin TUNCER² *^{1b}

¹ Van Yuzuncu Yil University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, 65040, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, 65040, Van, Turkey

Received: 22.08.2022

Accepted: 15.11.2022

ÖZ

Bu çalışma, Hakkâri ilindeki küçükbaş hayvancılık işletmelerinin (96 işletme) mevcut durumunun ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. İşletmeler için hazırlanan anket verileri 129 sorudan oluşturulmuştur. Anket verileri SPSS istatistik yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Hakkâri ili küçükbaş hayvan işletmelerinin %59.4'ünün Akkaraman koyunu ve Kıl keçisi yetiştiriciliğini birlikte yaptığı tespit edilmiştir (p<0.01). İşletmelerin %59.4'ünün yem ihtiyacının temininde satın alma yoluna gitmek zorunda kaldığı (p<0.05) ve yem bitkisi olarak en fazla yonca ekimini (%37.5) tercih ettikleri bulunmuştur. Küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin %40.6'sı hayvancılık desteği almadığını ifade etmiştir. Yetiştiricilerin %87.5'i desteklerin yetersiz olduğunu bildirmiştir (p<0.01). Yetiştiricilerin sadece %28.1'i mera ot kalitesini iyi olarak ifade etmiştir (p<0.05). Yetiştiricilerin %52.1'i yayla olanağı olduğunu bildirirken yaylaya en çok (%30.2) Mayıs ayında çıktıkları (p<0.05) ve 6 ay (%40.6) kaldıkları saptanmıştır (p<0.01). Koç/teke katımının aşım döneminde yapılma oranı %55.8 bulunurken geri kalanında (%44.2) bütün yıl boyunca sürüde tutulmaktadır. Doğumların başlangıcı en fazla şubat (%52.1) ayında olmakta ve çoğunlukla (%41.7) nisan ayında tümüyle bitmektedir. Damızlık seçiminde en önemli kriterler olarak, sağlık/yaş (%35.4) ve cüsse (%33.3) bulunmuştur. Küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin en önemli sorunlarının yem maliyetinin yüksek olması, mera kalitesinin yetersiz olması, yayla faaliyetlerindeki sorunlar ve ileri yaşlardaki erkeklerin damızlıkta kullanılması olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aile işletmesi, Anket yöntemi, Hakkâri, Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği.

ABSTRACT

Current Situation and General Problems of Small Ruminant Enterprises in Hakkâri Province

This study was carried out in order to reveal the current situation of small ruminant breeding enterprises (96 enterprises) in Hakkâri province. The survey data prepared for enterprises was formed from 129 questions. The survey data were evaluated with the SPSS statistical software program. It has been determined that Akkaraman sheep and hair goat are bred together in 59.4% of the sheep and goat farms in Hakkâri (p<0.01). It was found that 59.4% of the enterprises had to buy to supply their feed needs (p<0.05) and they mostly preferred alfalfa cultivation (37.5%) as a forage crop. 40.6% of small ruminant breeders stated that they did not receive livestock support. 87.5% of the breeders reported that the supports were insufficient (p<0.01). Only 28.1% of the breeders expressed the pasture grass quality as good (p<0.05). While 52.1% of the breeders reported that they had plateau opportunities, it was determined that they mostly (30.2%) went to the plateau in May (p<0.05) and stayed for 6 months (40.6%) (p<0.01). While the participation rate in the ram/goat mating period was 55.8%, in the rest (44.2%) rams and goats were kept in the herd throughout the year. Lambing took place in February (52.1%) the most, and mostly (41.7%) completely ended in April. Health/age (35.4%) and body size (33.3%) were found to be the most important criteria for breeder selection. It has been determined that the most important problems of small ruminant breeders are high cost of feed, insufficient pasture quality, problems in plateau activities and use of older men in breeding.

Keywords: Family enterprise, Hakkâri, Small ruminant breeding, Survey method.



GİRİŞ

Tarımsal faaliyetlerle birlikte yerleşik düzene geçen insanoğlu bu sayede en temel besin ihtiyaçlarının üretimini sağlamaya başlamıştır. Bu faaliyetler içerisinde değerlendirilen hayvancılık faaliyetleri ise evcilleştirilen hayvanların beslenme, üreme ve çoğalmalarını kolaylaştırarak onların ürünlerinden ve iş gücünden faydalanmayı kapsamaktadır (Gökburun 2018; Şahin ve Doğanay 2000).

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği bakımından, Doğu Anadolu Bölgesi'ni diğer coğrafik bölgelerden ayıran en önemli özelliği geniş mera alanlarının bulunmasıdır (Aşkın ve ark. 1996). Hakkâri ili 369.610 ha çayır-mera alanıyla (Ertuş 2019) ülke yüzölçümünün %17'sini oluşturan toplam çayır-mera alanının (Gökburun 2018) %2.46'sını oluşturmakta ve hayvancılığının bu bölgede tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden biri olmaktadır (Ertuş 2019). Çelik (2015), Türkiye'de 81 ilin hayvancılık verilerini, illerin benzerlik ve farklılıklarını ortaya koyarak konularının tespit edilmesi amacıyla çok boyutlu ölçekleme yöntemiyle analiz etmiştir. Analiz sonuçlarına göre, incelenen değişkenler bakımından Hakkâri ilinin de içinde bulunduğu ve ağırlıklı olarak Doğu Anadolu illerinin olduğu bazı iller Türkiye hayvancılık faaliyetine en büyük oranda pozitif katkı yapan yerleşim yerleri olarak saptanmıştır. 2021 yılı itibariyle Doğu Anadolu Bölgesi koyun varlığı (6 426 408 baş) Türkiye koyun mevcudunun (45 177 690 baş) yaklaşık olarak %14.22'sini oluştururken, Hakkâri ili (453 757 baş) Doğu Anadolu Bölgesi koyun mevcudunun yaklaşık %7'sini, Türkiye'nin (45 177 690 baş) yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Benzer şekilde Doğu Anadolu Bölgesi keçi mevcudu (1 743 457 baş) oransal olarak Türkiye keçi popülasyonunun (12 341 514 baş) %14.13'ünü kapsarken, Hakkâri ilinin keçi mevcudu (222 962 baş) Doğu Anadolu Bölgesi'nin yaklaşık %12.79'unu ve Türkiye'nin %1.81'ini oluşturmaktadır (TÜİK 2022).

Yunanistan'daki koyun yetiştiriciliği uygulamalarının üç farklı biçimde yapıldığı bildirilmiştir. Bunlardan ilkinin küçük sürü büyüklüğündeki yüksek verimli koyun ırklarının barınaklarında entansif olarak yetiştiriciliğinin yapılması, ikincisinin küçük ve orta sürü büyüklüğüne sahip işletmelerde (30-80 baş) ağılda yetiştirilen koyunların günün bazı saatlerinde çayıra otlatılması ve son olarak verimli küçük koyun ırklarının büyük kapasiteli işletmelerde yoğunlukla merada otlatılması (7-9 ay) olarak ifade edilmiştir (Hadji Georgiou ve ark. 2002). Mera'ya dayalı bir ekonomik faaliyet alanı olan küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yapılabilmesi için, yeterli mera alanının olması önemlidir (Deniz 2018).

Kaymakçı ve ark. (1998), yaptıkları çalışmanın sonucunda, Türkiye'de koyunların çoğunlukla meraya dayalı olarak beslendiğini bildirmiştir. Ayrıca meralarda otlatma faaliyetinin 6-8 ay sürdüğü ve yaylacılık faaliyetinin devam ettiği tespit edilmiştir. Koç katımının serbest yöntemlerle yapıldığı ve koçların sürüde uzun zaman kaldığı belirtilmiştir. Sürüye koç katımının eylül, ekim ve kasım aylarında yapıldığı, kuzuların sütten kesim yaşının 4 ay, sağma doğumdan 1-3 ay sonra başladığı ve sağım süresinin yaklaşık olarak 4-4.5 ay olduğu saptanmıştır.

Akkaraman koyunlarının meraya çıkma döneminin nisan-kasım aylarını kapsadığı ve koç katımının eylül-ekim, doğumun şubat ve mart aylarında yapıldığı saptanmıştır (Şireli 1996).

Geniş çayır-mera alanlarıyla ekstansif yetiştirme koşullarının baskın olduğu Hakkâri ilinin küçükbaş hayvan

yetiştiriciliğinde potansiyelini yeterince kullanmadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin mevcut durumu tespit edilerek sorunların çözümünde katkı sunması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın yapılması için gerekli izinler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Yayın Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar no: 2021/08/02; Karar tarihi: 17.12.2021).

Bu çalışmanın materyalini Hakkâri ili Merkez, Çukurca, Yüksekova, Şemdinli ve Derecik ilçelerinde faaliyet gösteren tabakalı örnekleme metoduyla (Erkuş ve ark. 1996) seçilen 96 küçükbaş hayvan işletmesi oluşturmuştur. Veriler 129 sorunun bulunduğu anket formu yoluyla işletme sahipleriyle yüz yüze yapılan görüşmeler sonucunda oluşturulmuştur.

İstatistik Analiz

96 işletmeden 129 sorudan oluşan anket çalışmasında, kategorik değişkenlere ait seviyelerin tespiti için frekans ve yüzde değerleri olarak ifade edilmiştir. Ankette sorulara verilen cevaplar arasında istatistiki olarak fark olup olmadığını belirlemek için iki grup oran testi (two proportion test) uygulanmıştır. İstatistik analiz için SPSS (ver: 25) paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

İşletmelerdeki Küçükbaş Hayvan İrkları ve Hayvancılığın Durumu

Tablo 1'de işletmelerde yetiştiriciliği yapılan küçükbaş hayvan ırkları ve hayvancılığın durumu ile genel bilgiler verilmiştir.

Hakkâri ili küçükbaş hayvan işletmelerinin büyük bir oranı (%59.4) Akkaraman koyunu ve Kıl keçisi yetiştiriciliğini birlikte yapmakta, %19.8'i yalnızca Kıl keçisi, %11.4'ü ise yalnızca Akkaraman koyunu bulundurmaktadır. İşletmesinde yalnızca Akkaraman koyunu yetiştirenlerle yalnızca Kıl keçisi yetiştirenler arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunurken, bunlarla; her iki türü bulunduran işletme sayılarıyla aralarındaki fark önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. İşletmelerin büyük bir kısmı (%75) daha önce başka bir hayvan türü bulundurmadığını bildirmiş ve daha önce bulunduranlarla aralarındaki fark istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Yöre hayvancılığının gerilediğini düşünen işletme sahiplerinin oranıyla (%78.1) tersini düşünen işletme sahipleri arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ($p<0.01$) saptanmıştır. Yöredeki hayvancılığın gerilediğini düşünenlerin en önemli nedenleri; yem fiyatı ile yasaklar (%28.2), yem fiyatı (%18.7) ve yem fiyatı ile çoban (%15.6) olarak bulunmuştur. Bu üç değişken arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

İşletmelerin Yem İhtiyacı

Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin yem temin yöntemleriyle ilgili cevapları Tablo 2'de verilmiştir.

Yem ihtiyacını satın alma yoluyla karşılayan işletmelerle (%59.4) kendi olanaklarıyla üreten işletmeler arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Yem satın alınan en fazla köyden (%31.2) ve ilçe merkezinden (%11.5) yapıldığı ifade edilmiştir. İşletmelerde yıllık en fazla satın alınan yem miktarları 1-10 ton (%38.6) ve 11-20 ton (%30.2) olarak saptanırken aralarındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Bu iki

seçenek ile diğer alım miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin ankette belirtilen yem kaynaklarından sırasıyla yonca (%37.5), buğday (%20.8), arpa (%2.1) ve korunga (%3.1) ekimini tercih ettikleri saptanmıştır.

Tablo 1. İşletmelerin küçükbaş hayvan ırkları ve hayvancılığın durumu.

Table 1. Small ruminant breeds of enterprises and status of livestock.

| | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---|--------------------|----------|
| İşletmedeki hayvan ırkları | | |
| Cevap yok | 9 | 9.4 |
| Akkaraman | 11 | 11.4a** |
| Kıl keçisi | 19 | 19.8a** |
| Akkaraman+Kıl keçisi | 57 | 59.4b** |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Daha önce başka hayvan türü de bulunduranlar | | |
| Evet | 24 | 25.0a** |
| Hayır | 72 | 75.0b** |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Hayvancılık yörenizde gerilediyse nedenleri | | |
| Evet | 75 | 78.1a** |
| Yem fiyatı | 18 | 18.7a** |
| Yasaklar | 2 | 2.1b** |
| Yem fiyatı+yasaklar | 27 | 28.2a** |
| Yem fiyatı+çoban | 15 | 15.6a** |
| Mera bölünmesi | 4 | 4.2b** |
| Yem fiyatı ve göç | 3 | 3.0b** |
| Yem+yasak+çoban | 4 | 4.2b** |
| Yem+mera bölünmesi | 2 | 2.1b** |
| Hayır | 14 | 14.6b** |
| Fikrim yok | 7 | 7.3 |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |

a, b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Yetiştiricilerin Faydalandığı Hayvansal Destekler

Anket çalışmasına katılan küçükbaş hayvan yetiştiricilerin desteklerle ilgili bilgileri Tablo 3'de verilmiştir.

Yetiştiricilerin önemli bir kısmı (%40.6) hayvancılık desteği almadığını belirtirken destek aldığını ifade eden işletmelerle arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bunun yanı sıra destekleri yetersiz bulan işletmelerle (%87.5) yeterli bulanlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0.01$) bulunduğu saptanmıştır. Çalışmada yetiştiriciler en fazla yem ihtiyaçlarına yönelik destek talebinde (%49.0) bulunurken başta nakit (%33.3) ve canlı hayvan (%12.5) olmak üzere diğer taleplerle arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Mera Kullanımı ve Otlatma Özellikleri

Çalışmanın yapıldığı küçükbaş hayvan işletmelerinde meradan yararlanma ve otlatma özellikleri ile ilgili anket sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. İşletmelerin meradan yararlanma oranı (%89.6) ve meraların köy ortak malı olma oranı (%87.5) yüksek olarak bulunurken diğer seçeneklerle arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Tablo 2. İşletmelerin yem ihtiyacı.

Table 2. Feed needs of enterprises.

| | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---|--------------------|----------|
| Yem temini | | |
| İşletmesinde üretiyor | 39 | 40.6a* |
| Satın alıyor | 57 | 59.4b* |
| Köyden | 30 | 31.2 |
| İlçe merkezinden | 11 | 11.5 |
| İl merkezinden | 3 | 3.1 |
| İl dışından | 9 | 9.4 |
| Devlet desteğiyle | 2 | 2.1 |
| Diğer | 2 | 2.1 |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Yıllık satın aldığınız yem miktarı | | |
| Cevap yok | 3 | 3.1 |
| 1-10 ton | 37 | 38.6a* |
| 11-20 ton | 29 | 30.2a* |
| 21-30 ton | 15 | 15.6b* |
| 31-40 ton | 4 | 4.2c* |
| 41-50 ton | 3 | 3.1c* |
| 51 ton+ | 5 | 5.2c* |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Ekimi tercih edilen yem bitkisi | | |
| Cevap yok | 5 | 5.2 |
| Buğday | 20 | 20.8a** |
| Arpa | 2 | 2.1b** |
| Yonca | 36 | 37.5a** |
| Korunga | 3 | 3.1b** |
| Diğer | 30 | 31.3a** |
| TOPLAM | 96 | 100.0 |

a, b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Köy ile mera mesafesi önemli oranda 6-10 km (%40.6) ve ≤ 5 km (%27.1) olarak tespit edilirken aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Sürüler meralara yoğunlukla ortak sürü oluşturularak (%67.7) çıkarıldığı ve meraya yoğunlukla (%82.3) nisan ayında çıktıkları, ekim ayında ise döndükleri saptanırken bu sorulara verilen diğer seçeneklerle aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Yetiştiricilerin %54.2'si merada münavebeli otlatma yaparken %45.9'u mera otlarını orta kalite olarak sınıflandırmış ve bu sorulara verilen diğer seçeneklerle aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Yetiştiricilerin %62.5'i ek yemleme uygulaması yapmadığını bildirirken yapanlarla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

Yayla Kullanımı

Hakkâri bölgesinde ankete katılan yetiştiricilerin yayla kullanımı ile ilgili bilgileri Tablo 5'de verilmiştir. Yetiştiricilerin %52.1'i yayla olanağı olduğunu, %44.8'i ise olmadığını bildirmiş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ankete cevap verenlerin çoğunluğu mayıs ayında (%30.2) yaylaya çıktıklarını bildirirken cevap verilen diğer aylarla aralarındaki farkın önemli ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Yaylada kaldıkları 6 aylık süre (%40.6) ve yaylaların köy ortak malı olduğu (%53.1) en çok cevap verilen seçenekler olurken diğer seçeneklerle aralarındaki farklar önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

Tablo 3. Yetiştiricilerin hayvansal destek beklentileri.**Table 3.** Animal support expectations of breeders.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---------------------------------|--------------|--------------------|----------|
| Hayvancılık desteği alma durumu | Cevap yok | 21 | 21.9 |
| | Evet | 36 | 37.5 |
| | Hayır | 39 | 40.6 |
| | TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Desteklerin yeterliliği | Cevap yok | 2 | 2.1 |
| | Evet | 3 | 3.1a** |
| | Hayır | 84 | 87.5b** |
| | Fikrim yok | 7 | 7.3 |
| | TOPLAM | 96 | 100.0 |
| Tercih edilen destek | Cevap yok | 1 | 1.0 |
| | Nakit | 32 | 33.3a* |
| | Canlı hayvan | 12 | 12.5b* |
| | Yem | 47 | 49.0c* |
| | Diğer | 4 | 4.2d* |
| | TOPLAM | 96 | 100.0 |

a, b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (*p<0.05; **p<0.01).

Tablo 4. Mera kullanımı ve otlatma özellikleri.**Table 4.** Pasture use and grazing characteristics.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---------------------------|-----------------|--------------------|----------|
| Meradan yararlanma durumu | Cevap yok | 3 | 3.1 |
| | Evet | 86 | 89.6a** |
| | Hayır | 7 | 7.3b** |
| Mera mülkiyeti | Cevap yok | 8 | 8.4 |
| | Köy ortak malı | 84 | 87.5a** |
| | Özel mülk | 4 | 4.1b** |
| Mera-köy mesafesi (km) | Cevap yok | 9 | 9.4 |
| | ≤5 | 26 | 27.1a* |
| | 6-10 | 39 | 40.6b* |
| | 11-15 | 16 | 16.7c* |
| Mera gidiş-dönüş | Cevap yok | 11 | 11.4 |
| | Mart-Kasım | 4 | 4.2a** |
| | Şubat-Ekim | 2 | 2.1a** |
| | Nisan-Ekim | 79 | 82.3b** |
| Sürünün meraya gitmesi | Cevap yok | 9 | 9.4 |
| | Tek aile sürüsü | 22 | 22.9a** |
| | Ortak sürü | 65 | 67.7b** |
| Merada münavebeli otlatma | Cevap yok | 10 | 10.4 |
| | Evet | 52 | 54.2a* |
| | Hayır | 34 | 35.4b* |
| Mera ot kalitesi | Cevap yok | 10 | 10.4 |
| | İyi | 27 | 28.1a* |
| | Orta | 44 | 45.9b* |
| | Zayıf (Kötü) | 15 | 15.6a* |
| Ek yemleme uygulaması | Cevap yok | 12 | 12.5 |
| | Evet | 24 | 25.0a** |
| | Hayır | 60 | 62.5b** |

a, b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (*p<0.05; **p<0.01).

Tablo 5. Yayla olanakları.**Table 5.** Plateau possibilities.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---------------------------|----------------|--------------------|----------|
| Yayla olanağı | Cevap yok | 3 | 3.1 |
| | Var | 50 | 52.1 |
| | Yok | 43 | 44.8 |
| Yayla çıkış zamanı | Cevap yok | 39 | 40.6 |
| | Nisan | 17 | 17.7a* |
| | Mayıs | 29 | 30.2b* |
| Yaylada kalış süresi (ay) | Haziran | 11 | 11.5a* |
| | Cevap yok | 40 | 41.7 |
| | 3 | 8 | 8.3a** |
| Yayla mülkiyeti | 4 | 6 | 6.3a** |
| | 5 | 3 | 3.1b** |
| | 6 | 39 | 40.6c** |
| | Cevap yok | 40 | 41.7 |
| Yayla mülkiyeti | Köy ortak malı | 51 | 53.1a** |
| | Özel mülk | 2 | 2.1b** |
| | Kiralık | 3 | 3.1b** |

a, b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (*p<0.05; **p<0.01).

Aşım Dönemi Uygulamaları

Aşım dönemi ile ilgili uygulamalar Tablo 6'da verilmiştir. Hakkâri ilindeki yetiştiricilerin koç/teke katımı büyük oranda (%89.6) serbest aşım olarak yapılırken elde aşım aralarındaki fark önemli (p<0.01) bulunmuştur. Serbest aşım yapan işletmelerde koç/teke katımının aşım döneminde yapılma oranı %55.8 bulunurken geri kalanında (%44.2) koç ve tekeler bütün yıl boyunca sürüde tutulmakta ve iki uygulama arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu saptanmıştır. İşletmelerin çoğunlukla (%57.3) 20-25 dişiye 1 erkek olarak planlama yaptığı bildirilirken diğer seçeneklerle arasındaki farklar istatistiki olarak önemli (p<0.01) bulunmuştur. Aşım başlangıç ve bitiş aylarına çoğunluk cevap verememekle birlikte (%68.8 ve %74) cevaplayanlar içinde en fazla sırasıyla ağustos (%14.6) ve ekim (%9.3) ayları olarak ifade edilmiştir. İşletmelerin çoğunluğunun (%55.2) çiftleşme öncesi ek yemleme yapmadığı ve yapanlarla arasındaki fark istatistiki olarak önemli (p<0.01) olduğu saptanmıştır.

Doğum Bilgileri

Doğum bilgileri Tablo 7'de verilmiştir. Koç/teke katım dönemine bağlı olarak gerçekleşen doğum başlangıçlarının en fazla sırasıyla; şubat (%52.1), ocak (%39.6) ve aralık (%8.3) aylarında olduğu tespit edilmiştir. Ocak ve şubat ayları arasındaki fark önemsiz bulunurken diğer aylarla aralarındaki farklar önemli (p<0.01) bulunmuştur. Nisan (%41.7), mart (%28.1), mayıs (%25), haziran (%3.1) ve şubat (%2.1) aylarında sürüdeki doğum faaliyeti tümüyle biterken nisan ayı ile diğer aylar arasındaki farkların önemli (p<0.01) olduğu tespit edilmiştir. Doğumların en yoğun olduğu ay önemli oranda (%85.4) şubat ayı olurken kendisini takip eden ocak (%11.5) ve mart (%3.1) aylarıyla arasındaki fark istatistiki olarak önemli (p<0.01) bulunmuştur. Hakkâri ilindeki küçükbaş hayvan işletmelerinin %44.8'inde temizlik veya kireçleme gibi doğuma özel herhangi bir hazırlık faaliyetinde bulunulmazken, %55.2'sinde hazırlık yapıldığı ve aralarındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmıştır. İşletmelerin yalnızca %22.9'unda özel doğum bölmesi bulunduğu ve farkın istatistiki olarak önemli (p<0.01) olduğu saptanmıştır.

Doğuma yardımcı olduğunu bildiren (%83.3) ve bu yardımın yavrunun annesini emmesine yardım olarak ifade edenler (%65.6) istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Doğumda kuzu/oğlak tartımının önemli oranda (%91.7) yapılmadığı tespit edilirken farkın istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) olduğu saptanmıştır.

Damızlık Seçimi Uygulamaları

Tablo 8'de küçükbaş hayvan işletmelerinde; erkek ve dişilerin damızlıkta kullanım yaşları ve süreleri, damızlık seçim ölçütü ve damızlık fazlası hayvanların değerlendirilme yöntemleri verilmiştir. Damızlıkta kullanım yaşı dişi koyun, koç, dişi keçi ve tekelerde sırasıyla; %70.8, %68.7, %83.4 ve %87.5 oranlarında 2 yaş olarak tespit edilmiş ve diğer yaşlarla aralarındaki farklar istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

Tablo 6. Aşım dönemi uygulamaları.

Table 6. The mating period applications.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|----------|
| Aşım yöntemi | Cevap yok | 10 | 10.4 |
| | Serbest aşım | 86 | 89.6a** |
| | Koç/teke aşım döneminde sürüde | 48 | 55.8 |
| | Koç/teke bütün yıl sürüde | 38 | 44.2 |
| | Elde aşım | 0 | 0b** |
| | Koç altı koyun sayısı | Cevap yok | 8 |
| 10-15 | | 5 | 5.2a** |
| 20-25 | | 55 | 57.3b** |
| 25-30 | | 25 | 26.1c** |
| 30-45 | | 3 | 3.1a** |
| Aşım başlangıç | Cevap yok | 66 | 68.7 |
| | Mayıs | 2 | 2.1a** |
| | Haziran | 2 | 2.1a** |
| | Temmuz | 2 | 2.1a** |
| | Ağustos | 14 | 14.6b** |
| | Eylül | 2 | 2.1a** |
| | Diğer | 8 | 8.3b** |
| Aşım bitiş | Cevap yok | 71 | 74.0 |
| | Temmuz | 2 | 2.1** |
| | Ağustos | 3 | 3.2b** |
| | Ekim | 9 | 9.3c** |
| | Diğer | 11 | 11.4c** |
| Çiftleşme öncesi ek yemleme | Cevap yok | 35 | 36.5 |
| | Evet | 8 | 8.3a** |
| | Hayır | 53 | 55.2b** |
| Ek yem kaynağı | Cevap yok | 79 | 82.3 |
| | Dane yem | 6 | 6.2a** |
| | Fabrika yemi | 6 | 6.2a** |
| | Diğer | 5 | 5.3a** |

a, b: Aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Damızlık seçiminde; sağlık/yaş (%35.4), cüsse (%33.3) ve tip (%21.9) en önemli kriterler olarak bulunurken aralarında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Bununla birlikte bu ölçütlerle en düşük kriter olarak tespit edilen süt verimi (%3.1) arasındaki farklar istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. İncelenen işletmelerin koyun ve keçilerinin damızlıkta kullanım süresi; koyun (%39.6), koç (%38.5), keçi (%42.7) ve tekelerde (%41.7) önemli oranda 7 yaş olarak tespit edilmiş ve diğer yaşlarla aralarındaki farklar istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Damızlık fazlası hayvanların çoğunlukla kurbanlık (%51) olarak değerlendirildiği ve diğer önemli tercihler olan besiciye satış (%20.8) ve işletmede besiyeye alma (%17.7) yöntemleriyle aralarında istatistiki olarak önemli farklar ($p<0.01$) bulunduğu saptanmıştır.

Tablo 7. Doğum bilgileri.

Table 7. Birth information.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|---|----------------------------|--------------------|----------|
| Doğumların başlangıcı | Aralık | 8 | 8.3a** |
| | Ocak | 38 | 39.6b** |
| | Şubat | 50 | 52.1b** |
| Doğumların bitişi | Şubat | 2 | 2.1a** |
| | Mart | 27 | 28.1b** |
| | Nisan | 40 | 41.7c** |
| | Mayıs | 24 | 25.0b** |
| | Haziran | 3 | 3.1a** |
| Doğumların en yoğun olduğu ay | Ocak | 11 | 11.5a** |
| | Şubat | 82 | 85.4b** |
| | Mart | 3 | 3.1c** |
| Doğuma özel hazırlık (temizlik, kireçleme vs) | Evet | 53 | 55.2 |
| | Hayır | 43 | 44.8 |
| Özel doğum bölmesi | Var | 22 | 22.9a** |
| | Yok | 74 | 77.1b** |
| Doğuma yardımcı olma durumu | Evet | 80 | 83.3a** |
| | Hayır | 16 | 16.7b** |
| Doğuma yardım biçimi | Cevap yok | 4 | 4.2 |
| | Zor doğuma müdahale | 29 | 30.2a** |
| | Kuzu/oğlak emmesine yardım | 63 | 65.6b** |
| Doğumda kuzu/oğlak tartımı | Evet | 8 | 8.3a** |
| | Hayır | 88 | 91.7b** |

a, b: Aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Tablo 8. İşletmelerin damızlık stok durumu.
Table 8. Breeder stock status of enterprises.

| | | İşletme sayısı (n) | Oran (%) |
|--|-------------------------|--------------------|----------|
| Koçlarda damızlık kullanım yaşı (yıl) | Cevap yok | 16 | 16.7 |
| | 1. yaş | 2 | 2.1a** |
| | 2. yaş | 66 | 68.7b** |
| | 3+ | 12 | 12.5c** |
| Dişi koyunlarda damızlık kullanım yaşı (yıl) | Cevap yok | 16 | 16.7a** |
| | 1. yaş | 2 | 2.1b** |
| | 2. yaş | 68 | 70.8c** |
| | 3+ | 10 | 10.4a** |
| Tekelerde damızlık kullanım yaşı (yıl) | Cevap yok | 8 | 8.3 |
| | 2. yaş | 84 | 87.5a** |
| | 3+ | 4 | 4.2b** |
| | Cevap yok | 7 | 7.3 |
| Dişi keçilerde damızlık kullanım yaşı (yıl) | 1. yaş | 4 | 4.1a** |
| | 2. yaş | 80 | 83.4b** |
| | 3+ | 5 | 5.2a** |
| | Cevap yok | 6 | 6.3 |
| Damızlık seçim ölçütü | Cüsse | 32 | 33.3a** |
| | Süt verimi | 3 | 3.1b** |
| | Sağlık /yaş | 34 | 35.4a** |
| | Tipe göre | 21 | 21.9a** |
| Koçlarda damızlıkta kullanım süresi (yıl) | Cevap yok | 14 | 14.6 |
| | 4 | 5 | 5.2a** |
| | 5 | 14 | 14.6b** |
| | 6 | 23 | 24.0b** |
| | 7 | 37 | 38.5c** |
| | 8 | 3 | 3.1a** |
| Dişi koyunlarda damızlıkta kullanım süresi (yıl) | Cevap yok | 15 | 15.6 |
| | 4 | 2 | 2.1a** |
| | 5 | 16 | 16.7b** |
| | 6 | 22 | 22.9c** |
| | 7 | 38 | 39.6d** |
| | 8 | 3 | 3.1a** |
| Tekelerde damızlıkta kullanım süresi (yıl) | Cevap yok | 8 | 8.4 |
| | 4 | 6 | 6.2a** |
| | 5 | 13 | 13.5b** |
| | 6 | 24 | 25.0c** |
| | 7 | 40 | 41.7d** |
| | 8 | 5 | 5.2a** |
| Dişi keçilerde damızlıkta kullanım süresi (yıl) | Cevap yok | 8 | 8.4 |
| | 4 | 5 | 5.2a** |
| | 5 | 11 | 11.5b** |
| | 6 | 25 | 26.0c** |
| | 7 | 41 | 42.7d** |
| | 8 | 6 | 6.2a** |
| Damızlık fazlası hayvanların değerlendirilmesi | Cevap yok | 4 | 4.2 |
| | Damızlık olarak satış | 6 | 6.3a** |
| | Besiciye satış | 20 | 20.8b** |
| | İşletmede besiyeye alma | 17 | 17.7b** |
| | Kurbanlık satış | 49 | 51.0c** |

a, b: Aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (*p<0.05; **p<0.01).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülke koşullarına adaptasyon yeteneğinin iyi olması nedeniyle Türkiye koyun mevcudunun ortalama %45'ini oluşturan Akkaraman koyununun (Ceyhan ve ark. 2019) ve keçi mevcudunun yaklaşık %98'ini oluşturan Kıl keçisinin (Keskin ve ark. 2017), Hakkâri ili işletmelerinde de yaygın olarak yetiştirildiği saptanmıştır. Hakkâri ili küçükbaş hayvan işletmelerinin büyük bir oranı (%59.4) Akkaraman koyunu ve Kıl keçisi yetiştiriciliğini birlikte yapmakta, %19.8'i yalnızca Kıl keçisi, %11.4'ü ise yalnızca Akkaraman koyunu bulundurmaktadır. Bu işletmelerin büyük bir kısmının (%75) daha önce başka bir hayvan türü bulundurmaması istikrarlı bir küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapıldığını ifade etmektedir. İşletmecilerin %78.1'i yöre hayvancılığının gerilediğini düşünmektedir. Nitekim 2015-2021 yılları arasında Hakkâri ilindeki koyun mevcudunda yaklaşık olarak %33 oranında bir azalmanın olduğu saptanmıştır (TÜİK 2022). Anket katılanların bunun en önemli nedenlerinin; yem fiyatı ile yasaklar (%28.2), yem fiyatı (%18.7) ve yem fiyatı ile çoban (%15.6) olduğunu bildirmiştir (Tablo 1). Bu sonuç özellikle beslenme sorununun hayvan yetiştiricilerinin en önemli sorunu olduğunu ortaya koymaktadır.

Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin hayvansal kaba yem olarak ankette bildirilenler içinden en fazla yonca ekimini (%37.5) tercih ederken; buğday (%20.8), arpa (%2.1) ve korunga (%3.1) diğer yem kaynakları olarak sıralanmıştır (Tablo 2). Yonca bitkisinin; Hakkâri Merkez (%77.5), Yüksekova (%82.7), Şemdinli (%86.2) ve Çukurca (%88.5) ilçelerinde yapılan bir başka çalışmada da ekimi en fazla yapılan kaba yem kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Ertuş 2019). Hayvan yetiştiriciliğinde en önemli maliyet unsuru olan yem masrafını (Satar ve Sakarya 2021) azaltabilmek için daha fazla yem bitkileri ekiminin yapılması ekonomik bir yetiştiricilik için önemlidir.

Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin önemli bir kısmı (%40.6) hayvancılık desteği aldığını belirtirken, yetiştiricilerin önemli bir kısmı da (%21.9) cevap vermek istememiştir. Yetiştiricilerin büyük bir çoğunluğu (%87.5) desteklerin yetersiz olduğunu bildirmiştir (Tablo 3). Nitekim yapılan bir araştırmada Hakkâri ilinin de bulunduğu Doğu Anadolu Bölgesi küçükbaş hayvan işletmelerinin toplam gelirleri içerisinde desteklemelerin %2.73'lük bir oranla yetersiz olduğu saptanmıştır (Satar ve Sakarya 2021). Mevcut çalışmada yetiştiriciler en fazla yem ihtiyaçlarına yönelik destek talebinde (%49.0) bulunurken bunu sırasıyla nakit (%33.3) ve canlı hayvan (%12.5) talepleri izlemiştir. Şanlıurfa'daki küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin önceliklerini kredi (%63.0), pazarlama (%13.0) ve bilgi (%10.7) destekleri oluştururken (Amak 2018), Mardin ili işletme sahipleri sırasıyla; finansal (%62.3), yem (%13.0) ve hayvan sağlığı (%9.1) destek talepleri olduğu tespit edilmiştir (Şan 2019). Hakkâri ilindeki yem kaynakları (çayır, mera ve yem bitkileri) mevcut hayvan varlığının beslenmesinde oldukça yetersiz kalmasından dolayı (Ertuş 2019) yem ihtiyacına yönelik destek talebi diğer illerden daha yüksek oranda saptanmış olabilir.

İncelenen küçükbaş hayvan işletmelerinin %89.6'sı meralardan faydalandığını ifade ederken (Tablo 4); bu oran Karaman (%76) (Şahinli 2014) ve Küçük Menderes Havzası koyunculuk işletmelerinden (%65.48) (Aydiner 2018) yüksek, Kırşehir ilindeki orandan düşük (%97) (Şimşek 2019) bulunmuştur. Meralar yüksek oranda (%87.5) köy ortak malı olarak bulunmuştur (Tablo 4). Bu oran; Niğde ili (%95.8) (Ceyhan ve ark. 2015), İzmir yöresi (%97.7) (Kandemir ve ark. 2015) ve Küçük Menderes

Havzası koyunculuk işletmeleriyle (%90) (Aydiner 2018) benzer, Karaman (%68) (Şahinli 2014) ve Sivas ili işletmelerinden (%70.65) (Çıkılı 2019) yüksektir. Meralara çoğunlukla ortak sürü oluşturularak (%67.7) çıkılmaktadır. Kırşehir ili yetiştiricileri (Ceyhan ve ark. 2015) sürülerini genellikle aile sürüsü (%84.4) olarak götürmekte, ortak sürü yöntemi düşük oranda (%15.6) tercih edilmektedir. Sürülerin meraya çoğunlukla (%82.3) nisan ayında çıktıkları, ekim ayında ise döndükleri saptanmıştır (Tablo 4). Meraya çıkış zamanı olarak nisan ayı Niğde ilinde (%55.2) (Ceyhan ve ark. 2015) ve Ardahan ilinde de (%66.7) (Demir ve ark. 2015) tercih edilmekle birlikte oransal olarak mevcut çalışmadan daha düşük bulunmuştur. Meradan dönüş ayı olarak aralık ayı Niğde (%56.3) (Ceyhan ve ark. 2015) ve Ardahan illerinde (%80.3) (Demir ve ark. 2015) daha çok tercih edilmekte olduğu bulunmuştur. Yetiştiricilerin çoğunluğu (%54.2) merada münavebeli otlatma yaptıklarını ifade etmiştir. Yetiştiricilerin %45.9'u mera otlarını orta kalite olarak sınıflandırmakla birlikte yetiştiricilerin %25'i ek yemleme uyguladığını bildirmiştir (Tablo 4). Ek yemlemenin, yetiştiricilerin bir kısmı tarafından tercih edilmesinden bu yetiştiricilerin meraları yeterli bulmadığı anlaşılmaktadır. Bursa ili yetiştiricilerinin de mevcut çalışmaya göre daha büyük bir oranı (%44.7) mera döneminde ek yemleme ihtiyacı duyduğunu bildirmiştir. (Dönmez 2008). Hakkâri ilinin de içinde olduğu coğrafyada hüküm süren kurak iklimden dolayı yaz aylarındaki düşük yağış miktarından ve erken başlayan yaz sıcaklarından etkilenen mera alanlarında, kapasitesinin üstünde sürülerle ve uzun sürelerde yapılacak otlatma (Turan ve ark. 2015) ve münavebeli otlatma sisteminin uygulanmamasının (Şahinli 2014) mera alanlarını önemli ölçüde zayıflatması nedeniyle ek yemleme ihtiyacı gereksinimi anlaşılabilir bir durumdur.

Yetiştiricilerin %52.1'i yayla olanağı olduğunu, %44.8'i ise olmadığını bildirmiştir. Anket cevap verenlerin çoğunluğu mayıs ayında (%30.2) yaylaya çıktıklarını, 6 ay kaldıklarını (%40.6) ve yaylaların köy ortak malı olduğunu (%53.1) bildirmiştir (Tablo 5). Diyarbakır ilindeki işletmelerin çoğunlukla haziran ayında (%65.8), çoğunlukla köy ortak malı (%67) olan yaylara çıktıkları ve 4 ay kaldıkları tespit edilmiştir (Dellal ve ark. 2002). Hakkâri ili Yüksekova ilçesinde yapılan bir araştırmada da küçükbaş hayvan yetiştiricilerinin %94.3'ünün yayla olanağı olduğu, %69.4'ünün yaylaya haziran ayında çıktığını ve %33.3'ünün 4 ay kaldığı saptanmıştır (Yılmaz 2016). Muğla ilinde ovada kışlayan sürüler mayıs-haziran döneminde yaylalara çıkarılırken, eylül-ekim aylarına kadar kalmaktadır (Aydın ve Keskin 2018). Doğu Anadolu Bölgesi'nin dağlık arazi yapısı ve geniş çayır alanlara sahip olması küçükbaş hayvan yetiştiriciliği için önemli bir altyapı sağlamakla (Karaca ve ark. 1993) birlikte işletmelerin sınırlı yayla faaliyeti yöreye özgü güvenlik politikalarının bir sonucu olabilir.

Bu çalışmada Hakkâri ilindeki yetiştiricilerin koç/teke katımı büyük oranda (%89.6) serbest aşım olarak yapıldığı ve koç/teke katımının aşım döneminde yapılma oranının %55.8 olduğu saptanmıştır. İşletmelerin çoğunlukla (%57.3) 20-25 dişiye 1 erkek olarak planlama yaptığı bulunurken aşım başlangıç ve bitiş aylarına çoğunluk cevap verememekle birlikte en fazla sırasıyla ağustos (%14.6) ve ekim (%9.3) ayları ifade edilmiştir. Ayrıca işletmelerin çoğunluğu (%55.2) çiftleşme öncesi ek yemleme yapmadığı saptanmıştır (Tablo 6). Van ilindeki işletmelerin büyük çoğunluğunun (%95.08) serbest aşım uyguladığı, koç ve tekelerin çoğunlukla (sırasıyla %55.71 ve %54.61) yalnızca aşım mevsiminde sürüye katıldığı

bildirilmiştir (Karakuş ve Akkol 2013). Niğde ilinde büyük oranda (%96.9) serbest aşım yapılmakta, koçlar çoğunlukla (%69.8) yalnızca koç katım döneminde sürüde bulundurulmaktadır. Koç başına ortalama 34 dişi hesaplanmakta, koç katımı büyük oranda Eylül-Ekim aylarında yapılmakta (%83.4) ve ekim-kasım aylarında sonlandırılmaktadır (%94.8). İşletmelerin %75'i aşım dönemi öncesi ek yemleme yapmaktadır (Ceyhan ve ark. 2015). İzmir ilindeki küçükbaş hayvan işletmelerinin tamamı (%100) serbest aşım yöntemini uygulamakta ve koç/tekelerin sürüde bulundurma süreleri çoğunlukla (%97.1) 6 ay ve üzeri olmaktadır. Aşım öncesi ek yemleme yapan işletmelerin oranı ise %52.7 bulunmuştur (Kandemir ve ark. 2015). Yüksekova'da yapılan bir çalışmada işletmelerin tamamı (%100) serbest aşım yöntemini uygularken, yetiştiricilerin önemli bir kısmının (%62) koç altı koyun sayısını 20-25 koyun olarak hesapladığı saptanmıştır. Yetiştiriciler koç/teke katımının başlangıcı olarak en yüksek oranda eylül ayı (%63.4), bitişini ise ekim ayı (%36.6) olarak bildirmiştir (Yılmaz 2016). Muğla ilindeki yetiştiricilerin çoğunluğunun koçları tüm yıl boyunca sürüde tuttuğu (%58) ve ankete katılan yetiştiricilerin çoğunluğunun koç katımı öncesi ek yemleme yaptığı (%68) bildirilmiştir (Aydın 2017). Mersin ili yetiştiricilerinde ise çiftleşme öncesi ek yemlemenin çoğunlukla (%68) uygulanmadığı tespit edilmiştir (Bebek ve Keskin 2018). Gaziantep ilinde düzenli bir koç/teke katım zamanı olmamakla birlikte haziran ayı %19.6 oranıyla diğer aylardan daha yüksek bulunmuştur ve koç katımı öncesi çoğunlukla (%57.1) ek yemleme yapıldığı saptanmıştır (Gül ve Örnek 2018). Erzincan ilinde işletmelerin tamamına yakınında (%93) serbest aşım uygulaması yapılırken koç katım dönemi öncesi büyük oranda (%91) ek yemleme yapılmaktadır (Özyürek ve ark. 2018). Gökçeada küçükbaş hayvan işletmelerinde de koç katım yöntemi olarak serbest aşım uygulamasının (%77.6) tercih edildiği bildirilmiştir (Özsayın ve Everest 2019). Ülkenin değişik coğrafyalarındaki işletmelerinde serbest aşım uygulamasının yüksek oranda tercih edilmesi koç/teke katımında geleneksel yönteminin kullanılmaya devam edildiğini göstermektedir. Türkiye'nin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede yazın sona ermesine yakın başlayan ve sonbahar sonlarına kadar devam eden ve halk arasında 'koç/teke katımı' mevsimi olarak da ifade edilen üreme sezonu (İbiş ve Ağaoğlu 2016) mevcut çalışmadaki zamanlamayla uyumludur. Aşım dönemi öncesi yapılacak ek yemleme uygulamasının döl veriminin artmasında önemli katkılar sağladığı bilinmektedir. Bununla birlikte çoğunlukla ek yemleme uygulamasının sınırlı kalmasının nedenleri yetiştiricilerin ek yemleme uygulamasının önemini yeterince bilmemeleri ve yem fiyatlarındaki yükseklik olabilir.

Hakkâri ilinde doğumların en fazla şubat (%52.1) ve ocak (%39.6) ayında yaşandığı ifade edilmiştir (Tablo 7). Niğde ilinde de doğumlar ocak ve mart arasında olmakla birlikte büyük oranda (%56.3) şubat ayında (Ceyhan ve ark. 2015) gerçekleşmektedir. Bununla birlikte Çanakkale'de kasım ayında başlayan doğumlar ocak ayının sonuna kadar (Ayağ 2014) devam etmektedir. Küçükmenderes havzası bölgesinde de doğumlar ekim ve ocak ayları arasında (Aydiner 2018) gerçekleşmektedir. Bunun nedeni batıdaki aşım döneminin bölgedeki mandıraların süt toplama zamanına göre ayarlanmasından (Ayağ 2014) ve doğudaki doğumların zorlu geçen kış mevsiminden dolayı daha geç planlanmasındandır (Aydiner 2018). Hakkâri ilindeki küçükbaş hayvan işletmelerinin %44.8'inde temizlik veya kireçleme gibi doğuma özel herhangi bir hazırlık faaliyetinde bulunulmazken, %55.2'sinde hazırlık yapıldığı

ve işletmelerin yalnızca %22.9'unda özel doğum bölmesi bulunduğu saptanmıştır (Tablo 7). GAP Bölgesi illerindeki yetiştiricilerin çoğunluğu (%54.6) doğuma hazırlık yaptığını ifade ederken (Dellal ve ark. 2002), Küçükmenderes havzası yetiştiricilerin %72.94'ünde doğuma hazırlık yapılırken ankete katılan işletmelerin %52.94'ünde doğum bölmesinin olduğu (Aydiner 2018) bulunmuştur. Ayrıca Afyon ili küçükbaş hayvan barınaklarının %86.70'inde (Serttaş 2019) ve Yozgat ili barınaklarının %63.5'inde de (Tüfekçi 2020) doğum bölmesinin bulunduğu bildirilmiştir. Özellikle Türkiye'nin batısındaki illerdeki yetiştiricilerle kıyaslandığında gerek doğum hazırlığı gerekse de doğum bölmesi bulundurma bakımından Hakkâri ili yetiştiricilerinin yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır. Bu konuda yetiştiriciye yönelik daha fazla bilgilendirme yapılması gerektiği düşünülmektedir. Yetiştiricilerin %83.3'ü doğuma yardımcı olduğunu bildirmiştir. En fazla (%65.6) yapılan yardım biçiminin yavrunun annesine emmesine yardım olarak saptanırken, yetiştiricilerin %30.2'si zor doğuma müdahalede bulunmak olarak cevaplamıştır (Tablo 7). Yüksekova'da yapılan benzer bir çalışmada (Yılmaz 2016) yetiştiricilerin doğuma yardım (%94) ve zor doğuma müdahale (%31.9) oranlarında mevcut çalışmayla benzerlikler tespit edilirken, kuzunun anasını emmesine yardımda (%31.9) yarıya yakın bir oranda azalma tespit edilmiştir. Kuzu telefatinin düşürülmesi için yetiştiricilere ilgili kurumlarca doğumla ilgili teknik ve sağlık hizmetlerinin daha da yaygınlaştırılması önemlidir. Hakkâri ilinde doğumda kuzu/oğlak tartımı da oldukça düşük oranda (%8.3) yapılırken (Tablo 7), İzmir yöresindeki işletmelerle benzer (%2.8) (Kandemir ve ark. 2015), Küçükmenderes havzası işletmelerinden oldukça düşük (%51.19) (Aydiner 2018) bulunmuştur. Kuzu/oğlak tartımının düşük oranda yapılması, yavruların doğum ağırlığına gebelikte yapılan ek yemlemenin olası payı hakkında bilgi sahibi olmayı sınırlayabilir.

Damızlıkta kullanım yaşı dişi koyun, koç, dişi keçi ve tekelerde sırasıyla; %70.8, %68.7, %83.4 ve %87.5 oranlarında 2 yaş olarak bulunmuştur (Tablo 8). Mevcut çalışmanın damızlıkta kullanım yaşı Viranşehir ilçesi işletmelerindeki dişi koyunlarla (18 ay), Niğde ili işletmelerindeki dişi (17.8 ay) ve erkek (18.2 ay) koyunlarla (Ceyhan ve ark. 2015) ve Yüksekova ilçesi işletmelerindeki dişi (18 ay) ve erkek (21 ay) küçükbaş hayvanlarla (Yılmaz 2016) benzer bulunurken, Muğla ilindeki koyun ve keçilerde çoğunlukla tercih edilen (sırasıyla %78 ve %52) 8-12 aylık yaşa (Aydın ve Keskin 2018) ve Küçükmenderes havzası işletmelerindeki dişilerin büyük oranda (%75.31) ilk defa kullanıldığı damızlık yaşına (12 ay) (Aydiner 2018) göre daha geç bulunmuştur. Uygun koşullar nedeniyle işletmesinde ıslah melezlemesi sonucu melez genotip bulunduran yetiştiriciler melez dişileri daha erken yaşta damızlıkta kullanmış olabilir. Çünkü melez genotip bulunduran işletmelerdeki hayvan materyalleri büyük olasılıkla yüksek gelişme hızı ve iyi besleme koşullarına sahiptir. Damızlık seçiminde; sağlık/yaş (%35.4), cüsse (%33.3) ve tip (%21.9) en önemli kriterler olarak bulunmuştur (Tablo 8). Özkan (2008) Viranşehir ilçesi işletmelerinde iyi gelişmiş, görünüşü iyi olan hayvanların damızlığa ayrıldığını bildirmiştir. Yılmaz (2016) Yüksekova ilçesinde damızlık seçiminde en fazla; cüsse ve ananın süt verimi (%20), cüsse (%16.9), tip (%10.9) ve cüsse ve tip (%10.9) gibi özelliklerin dikkate alındığını saptamıştır. İşletmelerde kayıt tutma olmadığından damızlık seçiminde subjektif kriterlerin dikkate alınması normal bir durumdur. İncelenen işletmelerin koyun ve keçilerinin damızlıkta

kullanım süresi; koyun (%79.2), koç (%77.1), keçi (%80.2) ve tekelerde (%80.2) önemli oranda 5-7 yaş olarak tespit edilmiştir (Tablo 8). Bursa ilinde damızlıkta kullanma süresi koyunlarda genellikle 5-6 yıl (%72.4), koçlarda ise 2-3 yaş (%85.1) olarak bulunmuştur (Dönmez 2008). Tüfekçi (2020) Yozgat ilindeki damızlıkta kullanım sürelerini koyunlarda 4-8 yaş (%88) olarak tespit ederken koçlarda önemli oranda 2 yıl (%47) olmak üzere 2-4 yıl (%92) olarak saptamıştır. Keçilerde de benzer şekilde dişilerde 4-8 yaş (%87) ve erkeklerde önemli oranda 2 yıl (%41) olmak üzere 2-4 yıl (%89.5) bulunmuştur. Hakkâri ilindeki işletmelerin küçükbaş hayvanlarda özellikle erkeklerin damızlıkta kullanım süresini uzun tutması generasyonlar arası süreyi uzatan olumsuz bir etki yapmaktadır. Damızlık fazlası hayvanlar çoğunlukla kurbanlık (%51) olarak değerlendirilirken, besiciye satış (%20.8) ve işletmede besiyeye alma (%17.7) diğer değerlendirme yöntemleri olarak bulunmuştur (Tablo 8). Bursa'daki işletmelerde damızlık fazlası hayvanların kasaplara satışı (%29.8) tercih edilirken (Dönmez 2008), GAP Bölgesi illerinde besicilerde (%75.3) (Dellal ve ark. 2002), Yüksekova'da ise en çok kurbanlık ve damızlık (%26.1) amaçlı satış yoluyla değerlendirme (Yılmaz 2016) yapıldığı bulunmuştur. Hakkâri ilinde kesimhane sıkıntısı nedeniyle doğrudan et olarak kasaplara satışlarda sıkıntı yaratmış olabilir.

Tarımsal istatistiklerle ilgili yapılan bu anket çalışmasında bazı kaygılar (vergi korkusu, önyargı vs.) nedeniyle yetiştiricinin soruların bir kısmını cevaplandırmasında isteksiz davranmasına neden olduğu gözlenmiştir. Buna ilave olarak tarımsal faaliyetlerle ilgili zaman içerikli bazı sorulara da cevap vermede sıkıntı yaşanmıştır. Araştırma sonucunda Hakkâri ili küçükbaş hayvan yetiştiricileri beslenme masrafını en önemli sorun olarak ifade etmiştir. Nitekim yetiştiricilerin en fazla yem ihtiyaçlarına destek talep ettiği bulunmuştur. Yetiştiricilerin önemli bir kısmı mera kalitesinin yetersiz olduğunu vurgulamıştır. Yetersiz kalitedeki mera alanlarının ıslah edilmesi, kapasitesini aşmayan sürülerle ve sürelerde otlatma yapılması sağlanmalıdır. Bölgenin yayla faaliyetlerine uygun coğrafik yapısı olmakla birlikte bölgenin kendine özgü koşulları nedeniyle uygulanan güvenlik politikaları sonucu yeterince değerlendirilememektedir. İşletme sahipleri aşım döneminde ek yemleme faaliyetlerinin sınırlı olarak yapıldığını bildirmiştir. Bu durumun nedeni yüksek yem masrafları ve döş veriminin artmasında sağladığı katkılarının yeterince bilinmemesi olabilir. İşletmelerde temizlik veya kireçleme gibi herhangi bir doğuma hazırlık ve özel doğum bölmesi bulundurma faaliyeti sınırlı bulunmuştur. İşletmelerde özellikle erkeklerin damızlıkta kullanma süresinin uzun tutulması nedeniyle jenerasyonlar arası süre uzadığı da tespit edilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışmanın yapılması için gerekli izinler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Yayın Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar no: 2021/08/02; Karar tarihi: 17.12.2021).

Bu çalışma Yusuf Demir isimli yazarın yüksek lisans tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: YD
Denetleme/Danışmanlık: SST
Veri Toplama ve/veya İşleme: YD
Analiz ve/veya Yorum: YD, SST
Makalenin Yazımı: SST
Eleştirel İnceleme: SST

KAYNAKLAR

- Amak A (2018).** Güneydoğu Anadolu Bölgesi Şanlıurfa Yöresindeki Küçükbaş Hayvan Barnaklarının Yapısal Yönden Araştırılması ve Geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
- Aşkın Y, Karaca O, Cemal İ, Çivi A (1996).** Doğu Anadolu göreneksel koyun yetiştirme sistemlerinin çağdaş ıslah programları bakımından potansiyelleri. Hayvancılık 96 Kongresi, İzmir, Türkiye.
- Ayağ BS (2014).** Çanakkale İli Geleneksel Süt Koyuncululuğu İşletmelerinin Yapısal Özellikleri Doktora tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, Türkiye.
- Aydın K (2017).** Muğla İlinde Ruminant Hayvancılığın Mevcut Durumu, Bazı Verim ve Yapısal Özellikleri. Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye.
- Aydın MK, Keskin M (2018).** Muğla ilinde küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yapısal özellikleri. *Mediterr Agric Sci*, 31 (3), 317-323.
- Aydiner R (2018).** Küçük Menderes Havzası Koyunculuk İşletmelerinin Yapısal Özellikleri. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Bebek DT, Keskin M (2018).** Mersin ilinde koyun yetiştiriciliğinin mevcut durumu bazı verim ve yapısal özellikleri. *MKU Tar Bil Derg*, 23 (2), 315-323.
- Ceyhan A, Şekeroğlu A, Duman M (2019).** Niğde ilinde yetiştirilen Akkaraman ırkı koyunların bazı döl verim özellikleri ve kuzuların büyüme performansı. *TURJAF*, 7 (10), 1509-1514.
- Ceyhan A, Şekeroğlu A, Ünal A ve ark. (2015).** Niğde ili koyunculuk işletmelerinin yapısal özellikleri ve sorunları üzerine bir araştırma. *KSÜ Doğa Bil Derg*, 18 (2), 60-68.
- Çelik Ş (2015).** Çok boyutlu ölçekleme analizi ile hayvancılık açısından Türkiye'de illerin sınıflandırılması. *Erciyes Üni Fen Bil Enst Derg*, 31 (4), 159-164.
- Çıkkılı G (2019).** Sivas İli Merkez İlçede Hayvansal Üretim Yapan İşletmelerin Mevcut Durumu ve Kredi Kullanımının Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Türkiye.
- Dellal G, Eliçin A, Tekel N, Dellal İ (2002).** GAP Bölgesinde Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Yapısal Özellikleri. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, Yay. No:82, Ankara, Türkiye.
- Demir AP, Işık AS, Aydın E, Yazıcı K, Ayvazoğlu C (2015).** Ardahan ilinde koyun yetiştiriciliğinin sosyo-ekonomik önemi. *Van Vet J*, 26 (3), 141-146.
- Deniz A (2018).** Hakkâri İli Merkez İlçede Koyunculuk Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi. Yüksek lisans tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Dönmez O (2008).** Bursa İli Koyunculuk İşletmelerinin Yetiştiricilik Açısından Yapısı. Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, Türkiye.
- Erkuş A, Turan A, Eliçin A ve ark. (1996).** Tekirdağ İli Tarım İşletmelerinde İthal ve Kültür Melezi Süt Sığırları ile Üretim Yapan İşletmelerde Süt Sığırcılığı Faaliyetlerinin Karşılaştırmalı Ekonomik Analizi. Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği ve Vakfı Yayınları. No:14, Ankara, Türkiye.
- Ertuş MM (2019).** Hakkâri'de sürdürülebilir mera kullanımı ve yem bitkileri üretimi. *DOFEBD*, 2 (1), 47-53.

- Gökburun İ (2018).** Yüksekova'da hayvancılık faaliyetlerinin geliştirilmesine yönelik öneriler. *IGGE*, 37, 204-218.
- Gül S, Örneç H (2018).** Gaziantep ilinde küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yapısal özellikleri I. koyun yetiştiriciliği. *MKU Tar Bil Derg*, 23 (2), 306-314.
- Hadjigeorgiou I, Vallerand F, Tsimpoukas K, Zervas G (2002).** The socio economics of sheep and goat farming in Greece, and the implications for future rural development. *Options Méditerr Sér B*, 39, 83-93.
- İbiş M, Ağaoğlu AR (2016).** Koyun ve keçilerde üremenin senkronizasyonu. *MAE Vet Fak Derg*, 1 (2), 47-53.
- Kandemir Ç, Alkan İ, Yılmaz Hİ ve ark. (2015).** İzmir yöresinde küçükbaş hayvancılık işletmelerinin coğrafik konumlarına göre genel durumu ve geliştirilme olanakları. *Hay Üret*, 56 (1), 1-17.
- Karaca O, Vanlı Y, Kaymakçı M, Altun T, Kaygısız A (1993).** Doğu Anadolu Bölgesinde koyun yetiştiriciliğinin sosyolojik, ekonomik ve genetik görünüşü. Y.Y.Ü. Araştırma Fonu 90-ZF-071 nolu Projenin Kesin Sonuç Raporu, Aynı Basım, Van, 23 s.
- Karakuş F, Akkol S (2013).** Van ili küçükbaş hayvancılık işletmelerinin mevcut durumu ve verimliliği etkileyen sorunların tespiti üzerine bir araştırma. *Van Yüzüncü Yıl Üni Fen Bilim Enst Derg*, 18 (1-2), 09-16.
- Kaymakçı M, Karaca O, Sönmez R (1998).** Doğu Anadolu Bölgesi koyuncululuğuna verilecek yön. Doğu Anadolu Tarım Kongresi Bildirileri, İzmir, Türkiye.
- Keskin M, Gül S, Biçer O, Gündüz Z (2017).** Kıl keçisi yetiştiriciliğinin organik üretim bakımından uygunluğu. *TURJAF*, 5 (13), 1700-1704.
- Özkan İ (2008).** Viranşehir İlçesinde Geleneksel Üretim Yapan Koyunculuk İşletmelerinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
- Özsayın D, Everest B (2019).** Koyun yetiştiriciliği yapan üreticilerin sosyo-ekonomik yapısı ve koyunculuk faaliyetiyle ilgili uygulamaları. *KSÜ Tar Doga Derg*, 22 (Ek sayı 2), 440-448.
- Özyürek S, Türkyılmaz D, Dağdelen Ü, Esenbuğa N, Yaprak M (2018).** Erzincan ili koyunculuk işletmelerinin yapısal özellikleri ve sorunlarının işletme büyüklüğüne göre incelenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 7 (2), 219-226.
- Satar M, Sakarya E (2021).** Kırsal kalkınma kapsamında, genç çiftçi projeleri ile desteklenen küçükbaş hayvancılık işletmelerinin sosyo-ekonomik analizi. *Eurasian J Vet Sci*, 37 (4), 274-285.
- Serttaş İ (2019).** Afyonkarahisar İli Hocalar İlçesine Bağlı Köy ve Beldelelerdeki Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Mevcut Durumunun Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur, Türkiye.
- Şahin C, Doğanay H (2000).** Türkiye Coğrafyası. Gündüz Eğitim ve Yayıncılık, Ankara, Türkiye.
- Şahinli MA (2014).** Koyunculuk sürü yönetimi: Karaman ili örneği. *Anadolu Tarım Bilim Derg*, 29 (2), 113-120.
- Şan M (2019).** Mardin Yöresinde Küçükbaş Hayvan Barnaklarının Yapısal Yönden Araştırılması ve Geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
- Şimşek G (2019).** Kırşehir İli Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği Yapan İşletmelerinin Teknik ve Ekonomik Yapılarının Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, Türkiye.
- Şireli HD (1996).** Tüm Yönleri ile Akkaraman Koyunları. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Turan N, Özyazıcı MA, Tantekin GY (2015).** Siirt ilinde çayır mera alanlarından ve yem bitkilerinden elde edilen kaba yem üretim potansiyeli. *TUTAD*, 2 (1), 69-75.
- Tüfekçi H (2020).** Yozgat ili küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yapısal durumu ve geliştirme olanaklarının belirlenmesi. *J Anim Prod*, 61 (1), 91-100.
- TÜİK (2022).** Türkiye İstatistik Kurumu. Hayvancılık istatistikleri. Erişim Tarihi: 25.04.2022. Erişim Adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr>.
- Yılmaz C (2016).** Hakkâri İli Yüksekova İlçesi Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Yapısal Durumu. Yüksek lisans tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.



Molecular Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus, Bovine Herpes Virus-1 and Bovine Herpes Virus-4 Infections in Abortion Cases of Cattle in Van District, Turkey

Hatice YILDIZ¹,* Ali Riza BABAOĞLU²

¹ Van Yuzuncu Yil University, Health Science Institute, Department of Microbiology, 65040, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 65040, Van, Turkey

Received: 22.08.2022

Accepted: 06.11.2022

ABSTRACT

Abortions, fetal mummification, calf anomalies, and infertility problems constitute most of the reproductive problems in cattle. Viruses play a significant role in the cause of these cases. In cattle, these agents are known as primary abortion agents and the most common of these agents are Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus Type 1 (BoHV-1), and Bovine Herpes Virus Type 4 (BoHV-4). The objective of this research is to determine the potential role of BVDV, BoHV-1, and BoHV-4 as viral abortion agents in cattle housed in the Van district. For this, a total of 115 animal specimens (blood, serum, vaginal swab, vaginal fluid discharge, nasal swab, and abortion material) from 100 abortion, early embryonic deaths, and infertility cases in cattle over the age of 2-5 years old were collected. All samples for detection of BVDV, BoHV-1 and BoHV-4 genomes were tested by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using specific primers encoding Panpesti 5'-UTR, Glycoprotein C (gC) and Glycoprotein B (gB) genes, respectively. Result out of the samples tested, 41.73% were positive for BVDV and all samples were negative for BoHV-1 and BoHV-4. In conclusion, the presence of BVDV in cattle in the Van region and its role in the occurrence of abortion cases was emphasized for the first time. It is necessary to the consideration of viral abortions and determine the etiology of abortion cases and genital system problems. According to this, we need to focus on the detection of persistently infected (PI) animals for prevention and control of infection and the most effective way of vaccinating susceptible populations.

Keywords: Abortion, BoHV-1, BoHV-4, BVDV, Cattle, Van.

ÖZ

Van Yöresi Sığırlarında Bovine Viral Diyare Virus, Bovine Herpes Virus-1 ve Bovine Herpes Virus-4 Nedenli Abort Olgularının Moleküler Olarak Araştırılması

Sığırlarda görülen reproduktif problemlerin başında abortlar, fetal mumifikasyon, anomali yavru doğumları ve döl tutmama sorunları gelmektedir. Bu olguların sebeplerinin arasında viruslar önemli bir paya sahiptir. Viral enfeksiyonların en yaygın olanları ve sığırlarda primer abort etkenleri olarak bilinen; Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus Tip 1 (BoHV-1) ve Bovine Herpes Virus Tip 4 (BoHV-4) viruslarıdır. Van yöresinde yetiştirilen sığırlarda BVDV, BoHV-1 ve BoHV-4 enfeksiyonlarının viral abort etkenleri olarak olası rolünün ortaya çıkması bu araştırmanın öncelikli hedefi olarak belirlenmektedir. Bu amaçla, abort, erken embriyonik ölümler, anomali yavru doğumları ve fertilitate problemi olan 2-5 yaşları arasında 100 adet sığırdan toplam 115 adet örnek (Tam kan, kan serumu, vaginal swab, vaginal sıvı akıntısı, nazal swab ve abort materyali) alındı. Bu örnekler BVDV, BoHV-1 ve BoHV-4 nükleik asit varlığı yönünden sırasıyla Panpesti 5'-UTR, Glikoprotein C (gC) ve Glikoprotein B (gB) genini kodlayan spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği ile test edildi. Söz konusu örneklerin %41.73'ü BVDV nükleik asiti varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi, BoHV-1 ve BoHV-4 nükleik asiti yönünden pozitif örneğe rastlanmadı. Sonuç olarak, Van yöresindeki sığırlarda BVDV enfeksiyonunun varlığı ve abort olgularının oluşumundaki rolü ilk kez ortaya konulmuş; abortların ve genital kanal problemlerin etiolojisinin belirlenmesine ve viral abortlara dikkat çekerek, enfeksiyonunun korunma-kontrol programında uygulanan en etkili yolun persiste enfekte (PI) hayvanların tespiti ve duyarlı popülasyonun aşılmasını üzerinde durulması vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Abort, BoHV-1, BoHV-4, BVDV, Sığır, Van.



INTRODUCTION

The potential impact of viral infections on fertility and reproduction is frequently ignored, despite the fact that they continue to be a significant source of economic loss for the modern cattle industry. Although most deaths in cattle occur around birth and one week of age, the rate of embryonic loss is generally higher than perinatal loss. Most abortions occur sporadically, and just <5% of pregnant animals have abortions (Wathes et al. 2020). Average abortion rates in cattle herds are 1.5–2%, and a higher abortion rate might result in financial losses. Therefore, abortions are considered a significant loss in milk and meat production, so it is crucial to identify the agents and implement effective control measures to prevent them (Yildirim et al. 2011).

The causative agents of abortion are classified as infectious and non-infectious. Non-infectious causes include genetic, hormonal disorders, breeder-link (such as care-feeding), climatic conditions (such as heat stress), iatrogenic, and toxic factors. Infectious agents include microorganisms such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses. Among the infectious agents that cause abortions, the role of viruses is considerable. The viral agents that infect the genital system, infertility and abortions in cattle are listed in Table 1. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus Type 1 (BoHV-1), and Bovine Herpes Virus Type 4 (BoHV-4) are known as the viral agents commonly seen in cases of reproductive disorders in cattle such as abortion, neonatal death, and births with congenital abnormalities (Doğan and Bilge Dağalp 2017; Bilge Dağalp et al. 2020).

Table 1. The list of important viral agents causing abortions in cattle (Doğan and Bilge Dağalp 2017).

| Virus | Family | Subfamily/Genus | Species/Agent |
|-------------------|----------------------|---|-----------------------|
| BoHV-1* | <i>Herpesviridae</i> | <i>Alfaherpesvirinae/Varicellavirus</i> | BoHV-1.1 BoHV-1.2a |
| BoHV-4* | <i>Herpesviridae</i> | <i>Gammaherpesvirine/Rhadinovirus</i> | BoHV-4 |
| BVDV* | <i>Flaviviridae</i> | <i>Pestivirus</i> | BVDV-1, BVDV-2 |
| BTV* | <i>Reoviridae</i> | <i>Orbivirus</i> | BTV (1-27) |
| AKAV* | <i>Bunyaviridae</i> | <i>Orthobunyavirus/Simbu serogrup</i> | AKAV |
| SBV* | <i>Bunyaviridae</i> | <i>Orthobunyavirus/Simbu serogrup</i> | SBV |
| RVFV | <i>Bunyaviridae</i> | <i>Phlebovirus</i> | RVFV |
| Aino virus | <i>Bunyaviridae</i> | <i>Orthobunyavirus</i> | Aino virus |
| EHDV | <i>Reoviridae</i> | <i>Orbivirus</i> | EHDV (1-10) |
| Wesselborn virus | <i>Flaviviridae</i> | <i>Flavivirus</i> | WSL |
| LSD | <i>Poxviridae</i> | <i>Chordopoxvirinae</i> | Capripoxvirus |
| Bovine parvovirus | <i>Parvoviridae</i> | <i>Bovine parvovirus</i> | BoPV (1-3) |

BoHV-1 and BoHV-4 infections affect the respiratory and genital systems, and BVDV infection can occur with various clinical manifestations in the respiratory, genital, and gastrointestinal systems. These viruses can also cause deadly fetal infections by crossing the maternal and fetal barrier following viremia (Ackerman and Engels 2006). In viral infections, molecular diagnostic techniques such as polymerase chain reaction (PCR) for direct detection of the viral genome have been determined as a specific and sensitive alternative method, since PCR is 2-100 times more sensitive and provides results faster than compared to virus isolation (Van Engelenburg et al. 1993).

BVDV infection: BVDV causes diarrhea and acute infection in cattle known as contagious viral diarrhea (VD) (Denise Goens 2002). The fatal form of BVDV was defined as Mucosal Disease (MD). BVDV belongs to the *Pestivirus* genus of the *Flaviviridae* family; it is enveloped, approximately 12.3-12.5 kilobases (kb) in length, single-strand, positive sense RNA genome, and surrounded by a 5'-3' untranslated region (UTR) (Baker 1995). Two different genotypes, BVDV-1 and BVDV-2, have been defined due to variation in the nucleotide sequence of the 5' UTR, envelope glycoprotein (E2) and autoprotease (Npro) coding regions of the BVDV genome (Vilcek et al. 1994). The first live BVDV vaccine was administered in 1961, and immunotolerance persistent infection (PI) was described in animals in 1973 (Denise Goens 2002). There are two different biotypes of BVDV, including cytopathogenic (cp) and non-cytopathogenic (ncp) strains. BVDV-cp strains were isolated from cattle diagnosed with MD, while ncp strains are common in nature and cause persistent infected (PI) in calves (Schweizer et al. 2006).

BVDV infection is endemic in cattle populations in many districts of the world. According to serological studies conducted in various geographical regions, the incidence of BVDV infection in individual cattle ranges from 40-90% and in cattle herds from 28-66%, with 0.5-2.5% of calves detected as PI (Oguejiofor et al. 2019). PI animals have a significant role in infection transmission. These animals asymptotically infect healthy animals in the herd with their body fluids. Furthermore, the use of infected bulls in natural copulation or artificial insemination procedures is a significant factor in virus spread (Kirkland et al. 1991). Acute BVDV infection not only causes clinical symptoms in the respiratory, gastrointestinal, reproductive, and central nervous system, but it also causes reproductive problems including abortion, infertility, early embryonic deaths, and congenital malformations. The severity of the infection varies based on the virus's biotype, virulence, and the period of pregnancy at the time of infection. PI calves are born as a result of BVDV infection after 30 days of pregnancy (Baker 1995; Oğuzoğlu et al. 2012). Therefore, studying the presence and possible effects of BVDV on cattle abortions and reproductive problems is critical for designing and developing effective control-eradication strategies, including vaccination.

BoHV-1 infection: BoHV-1 causes infection in cattle with a variety of clinical symptoms such as rhinotracheitis, pustular vulvovaginitis and balanoposthitis, abortion, infertility, conjunctivitis, and encephalitis. The respiratory form of this infection is known as "infectious bovine rhinotracheitis" (IBR), a severe and highly contagious respiratory system disease, whereas the genital form in cows is known as "infectious pustular vulvovaginitis" (IPV), which is abortion and lethal systemic disorders in newborns are the most serious effects of this form (Muyilkens et al. 2007).

BoHV-1 is a significant pathogen in cattle and belongs to the *Herpesviridae* family, *Alfaherpesvirinae* subfamily, *Varicellovirus* genus. Viral genome with 135-140 kb in length and double-stranded DNA encodes nearly 70 proteins, 33 of which are structural proteins (SP) and 15 non-structural proteins (NSPs). According to genetic diversity and clinical symptom variety, BoHV-1 isolates are classified into three subtypes: BoHV-1.1, BoHV-1.2a, and BoHV-1.2b (Spilki et al. 2004; ICTV 2012).

BoHV-1 infection is transmitted between animals directly or indirectly. Direct transmission usually occurs in direct contact with an infected animal, while indirect

transmission occurs through nasal exudate, genital secretions, fetal fluids, fetal tissues, and semen. Transmission of infection also occurs during artificial insemination and embryo transfer applications with infected semen. This infection causes economic losses due to weight loss in animals, a decrease in milk production, and restrictions on animal trade (Van Schaik et al. 2001).

BoHV-1 affects all cattle populations worldwide, with a high prevalence of infection in Australia, New Zealand, Canada, the United States, Zaire, Italy, Belgium, India, and Turkey (Dağalp et al. 2012). The control of the infection with vaccination usually prevents the development of clinical signs and can significantly reduce the spread of the virus after infection. However, vaccination cannot completely prevent the disease. Since BoHV-1 is a latent infection and highly contagious virus, vaccination is usually recommended at 4-6 months of age after decreased passive immunity in calves (Kaur 2016).

BoHV-4 infection: BoHV-4 is a worldwide distributed virus that is characterized by symptoms such as reproductive and respiratory system disorders, mastitis, dermatitis, and conjunctivitis in cattle and causes considerable economic losses in cattle breeding due to the direct or indirect effects of these problems. The virus was first isolated from cattle with respiratory symptoms in Hungary in 1963 and later in the USA (Mohanty et al. 1971). Subsequently, the virus was isolated from cattle with clinical signs such as conjunctivitis, pneumonia and upper respiratory tract infections, skin lesions, mamillitis, enteritis, postpartum metritis, chronic metritis, and mastitis (Bilge Dağalp et al. 2020).

BoHV-4 is a member of the *Herpesviridae* family, *Gammaherpesvirinae* subfamily, and *Rhadinovirus* genus (ICTV 2012). The virus contains an enveloped, 100 nm diameter icosahedral nucleocapsid and a proteinaceous tegument. The viral genome consists of 144 ± 6 kb of double-stranded linear DNA (Zimmermann et al. 2001). Primary replication of the virus occurs within epithelial cells in the mucosa. Then the virus infects blood mononuclear cells and has an affinity for vascular endothelium, mammary tissue, endometrium, and fetal tissues. This virus causes latent persistent infection in blood leukocytes, spleen macrophages, and endothelial cells that can be reactivated by corticosteroids or stress in various tissues (Dağalp et al. 2012; Chastant-Maillard 2015).

Control of the BoHV-4 infection can be achieved by applying good hygienic measures and removing seropositive animals from the herd. Infected cows should be isolated after calving since high amounts of viruses can be shed in uterine exudates in cases of metritis. Direct contact between seropositive and seronegative animals should be avoided, as the virus is generally spread through the respiratory route (Thiry et al. 1990).

Based on the above-mentioned data, determining the potential impact and etiology of BVDV, BoHV-1, and BoHV-4 infections on abortion is extremely important due to the intensive animal husbandry and extensive production of animal products in the Van region. Therefore, the aim of this study was to conduct a molecular investigation into the role of BVDV, BoHV-1, and BoHV-4 infections in cattle abortion cases in the Van province for the first time.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Local Ethics Committee (Approval date: 26/03/2020, Decision no: 2020/03).

Study Area and Sampling

This study was carried out on cattle bred by the public in the province of Van, located in the Eastern Anatolia region of Turkey, from September 2019 until June 2021. One hundred cattle with abortions, past aborted and early embryonic deaths (69 abortions, 28 past aborted and 3 embryonic deaths) aged 2-5 years and unvaccinated against the above-mentioned infections were sampled. A total of 115 animal specimens were taken from 100 cattle, including 97 EDTA blood, three blood serum, four vaginal swabs, three vaginal fluid discharge, one nasal swab, and seven abortion materials.

DNA and RNA Extraction

Blood samples (4 mL) taken into tubes with anticoagulant (EDTA) (Vacuette, Austria) were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, the upper plasma was discarded, and the leukocyte layer was transferred to sterile 1.5 mL tubes. After washing the leukocytes with the antibiotic PBS three times, they are stored at -80°C for use in molecular studies. Abortion materials were homogenized in 1/10 antibiotic PBS in a homogenizer, then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, and the supernatant was taken into a sterile stock tube. Swab and fluid samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm in a sterile tube after vortexing, and the supernatant was stored in a sterile stock tube at -80°C to be used in studies for virological control. Viral RNA isolation for detection of BVDV nucleic acid and viral DNA isolation for detection of BoHV-1 and BoHV-4 was performed on a total of 115 samples taken into tubes using a universal RNA extraction kit for purification of genomic RNA (EURx, Poland) and a universal DNA extraction kit for isolation of DNA (EURx, Poland) as indicated in the manufacturer's recommendation. The extracted genomic RNA (gRNA) and DNA samples were stored at -80°C until used in the following study phase.

BVDV, BoHV-1 and BoHV-4 Nucleic Acid Detection

To detect the presence of BVDV nucleic acid after RNA extraction, reverse transcription PCR (RT-PCR) assay was employed on all RNA samples, using the OneStep RT-PCR kit (Grisp, Portugal) as described in the manufacturer's recommendation. An RT-PCR assay was run using primers encoding the 5'-UTR Panpesti gene region as described previously with minor modification (Vilcek et al. 1994). Briefly, sense and antisense primers (5'-ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-3' and 5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3') were used to amplify a 288 bp length fragment of BVDV. In the RT-PCR assay, positive and negative controls were processed with all samples as a standard control. The thermocycler conditions in the RT-PCR reaction were set as one cycle for reverse transcription at 45°C for 15 minutes, followed by a single cycle at 94°C for 5 minutes and 35 cycles at 94°C for 30 seconds and 56°C for 45 seconds and 72°C for 1 minute. Finally, extension is followed by a single cycle at 72°C for 10 minutes.

To detect the BoHV-1 genome, PCR assay was performed on all extracted DNA samples using the method described by Van Engelenburg et al. (1993) with some modifications. The detection of the BoHV-4 genome was performed using a PCR assay on all extracted DNA samples as described by Wellenberg et al. (2001) with minor modification. The

primer sequences for amplification of the gene regions encoding the glycoprotein C (gC) gene for BoHV-1 (gC1:5'-TGTGACTTGGTGCCCATGTCGC-3' and gC2:5'-GAGCAAAGCCCCGCAAGGAG-3') and the glycoprotein B (gB) gene for BoHV-4 (gB1:5'-CCCTTCTTTACCACCACCTACA-3' and gB2:5'-TGCCATAGCAGAAAACAATGA-3') were used to amplify a 389 bp and 615 bp length PCR product, respectively. PCR reaction mixture containing 3 µl of extracted DNA, 0.5 µM each primer, 2.5 µM 10X Taq buffer and 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µl dNTP mix (10 mM), and 0.5 µl (5u/µl) of Taq DNA polymerase in a total volume of 25 µl. In the PCR assay, positive and negative controls were processed with all samples as a standard control. The thermocycler conditions in the PCR assay were set as one cycle at 94 °C for 5 minutes and 35 cycles at 94 °C for 30 seconds and 56 °C for 45 seconds and 72 °C for 1 minute. Finally, extension is followed by single cycle at 72 °C for 10 minutes.

Statistical Analysis

In this study, SPSS (IBM SPSS for Windows ver. 22) statistical package program was used for the analysis of all data.

RESULTS

The expected size of amplicons following RT-PCR and PCR processes were run on a 1.5% agarose gel accompanied by positive and negative controls, visualized in a UV transilluminator (Figure 1). In an RT-PCR assay using panpesti primers, it was determined that 48 samples out of 115 samples (34/100 animals) were positive for BVDV nucleic acid. Based on sample types, 39 leukocytes (39/97), one blood serum (1/3), three vaginal swabs (3/4), one vaginal fluid (1/3), and four abortion materials (4/7) were evaluated positively for BVDV nucleic acid. Thus, the BVDV positivity rate was determined as 41.73% in total samples and 34% on an animal basis. In order to detect the presence of BoHV-1 and BoHV-4 DNAs, the PCR products obtained following the PCR process were run on a 1% agarose gel and visualized on a UV transilluminator. In 115 samples tested by PCR, no fragment was amplified at 389 bp or 615 bp length, and there was no positivity for BoHV-1 and BoHV-4. Data for sample types and PCR results for BVDV, BoHV-1 and BoHV-4 were summarized in Table 2.

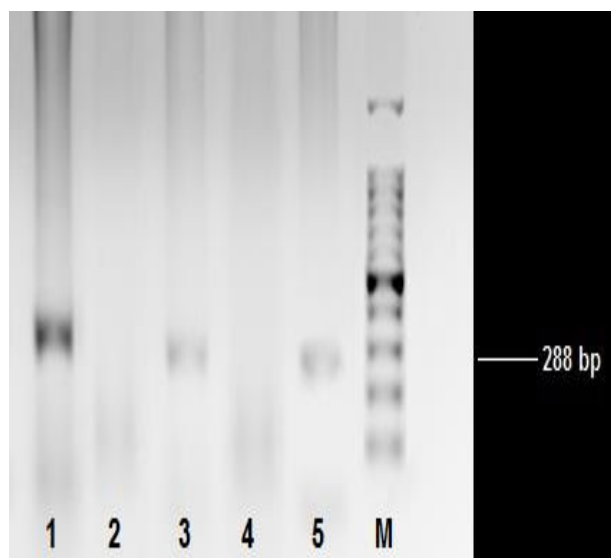


Figure 1. The result of BVDV in the RT-PCR assay. Line M: 100bp DNA ladder, Line 1: Positive control, Line 2: Negative control, Line 3 and 5: positive animal samples, Line 4: Negative animal sample.

Table 2. Sample types, number of material and viral nucleic acid detection in PCR assay in the tested animals.

| Sample Type | The number Of materials | BVDV RT-PCR positive (%) | BoHV-1 PCR positive | BoHV-4 PCR positive |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Leukocyte | 97 | 39 | - | - |
| Serum | 3 | 1 | - | - |
| Vaginal swab | 4 | 3 | - | - |
| Vaginal discharge | 3 | 1 | - | - |
| Nasal swab | 1 | - | - | - |
| Abortion material | 7 | 4 | - | - |
| Total | 115 | 48 (41.73%) | - | - |

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, the roles of BoHV-1, BoHV-4 and BVDV in the abortion cases were investigated virologically in cattle housed in Van province. BVDV is widespread all over the world and causes significant economic losses in cattle breeding due to its effects on reproduction and health. The seropositivity rates varied in different regions and were reported at between 12% and 89% (Cowley et al. 2014).

BVDV infection was first detected and diagnosed based on clinical disease findings in cows in Turkey in 1964 (Öncül et al. 1964). According to studies on BVDV infection carried out in various districts of Turkey, the seropositivity has been determined to be 50% on average, and it was reported that the infection is widespread, persistently infected animal births, and abortion can occur at any stage of the infection (Burgu et al. 2003; Yildirim et al. 2011; Oğuzoğlu et al. 2012; Yılmaz 2015; Bilgili and Mamak 2019; Timurkan and Aydın, 2019). In the last 5 years, studies focused on BVDV infection in different regions of Turkey reported that, the average seropositivity rate was 56.97%, the average rate of PI animals was 2.8%, and the average rate of BVDV nucleic acid presence in cattle with abortion problems was reported as 44.68% (Yılmaz et al. 2016; Özgünlük and Yıldırım 2017; Aldemir and Başbuğ, 2019; Bilgili and Mamak, 2019; İnce 2020; Demirsoy and Mamak 2020; Gürçay et al. 2020).

In this study, the presence of BVDV nucleic acid was detected at 41.73% (48/115) on a sample basis and 34% (34/100) on an animal basis in samples collected from cattle with reproductive disorders or abortion problems in the RT-PCR assay. It is clear that the results of the study carried out to support the findings of the studies (Yılmaz et al. 2016; Gürçay et al. 2020) carried out in areas close to the Van province and in other provinces of Turkey. It is thought that the high rate of animals found positive for BVDV infection was due to the fact that the majority of the sampled animals were managed in animal husbandry with traditional methods, PI animals were not detected and removed, and vaccination programs are not implemented. As a result of the information received from animal farm owners, it was concluded that the hygiene of the enterprise was insufficient and there was a lack of information about the control and prevention of disease.

BoHV-1 infection is recognized as an acute and latent viral infection with variable prevalence and incidence rates depending on geographic location and breeding factors in different countries (Van Schaik et al. 2001). Numerous studies regarding viral agents in cases of cattle abortion and seroprevalence of BoHV-1 in Turkey indicate the importance of BoHV-1 infection (Alkan et al. 2005; Dağalp et al. 2012; Tuncer-Göktuna et al. 2016; Doğan and Bilge

Dağalp 2017; Yilmaz et al. 2017; Yilmaz et al. 2020). The average seroprevalence rate for BoHV-1 as determined by serological research in various regions of Turkey in recent years was 36.22% (Özgünlük and Yıldırım 2017; Altun et al. 2019; Gür et al. 2019; Kadiroğlu et al. 2020). Altun et al. (2019) investigated the presence of BoHV-1 using the q-real time-PCR method in Erzurum and it was reported that the presence of BoHV-1 nucleic acid was 13.33%. In a study conducted in the provinces of Ankara, Çorum, Kırıkkale, and Yozgat, a positivity rate of 0.39% was found in PCR assay in blood samples found to be BoHV-1 seropositive in cattle with abortion and infertility problems (Aslan et al. 2015).

In this study, no positivity for BoHV-1 nucleic acid was found among 115 samples collected from 100 cattle in PCR assay. It can be noted that the results are identical with those of a study conducted in the province of Kars, which is close to the sampled Van province (Yilmaz et al. 2016), as well as with those of a study including the provinces of Konya, Aksaray, and Niğde (Şevik and Avcı 2015). It is believed that the inconsistency between these results and those of studies done on other districts of Turkey may be due to a wide range of factors such as geographic location, virus circulation, and growth conditions.

BoHV-4, which causes reproductive problems in many animal species, particularly cattle, was identified in both healthy and aborted cattle in the world, including in Turkey. This virus is a contributing factor in cases of cattle abortion along with other pathogens such as viruses, bacteria, and protozoans (Bilge Dağalp et al. 2020).

Numerous studies conducted on BoHV-4 in many countries, including Turkey, revealed varying seropositivity rates in cattle. The presence of BoHV-4 infection was first demonstrated serologically in Turkey in 2007, when 877 bovine serum samples were tested by ELISA in the study, and the seropositivity rate was reported as 54.3% (Bilge Dağalp et al. 2007). Another study (Bilge Dağalp et al. 2010) investigated the BoHV-4 in a dairy cattle herd with metritis problems serologically and molecularly; seropositivity was 69.6%, and BoHV-4 nucleic acid detection was 29%. A study on the potential role of BoHV-4 in cow infertility determined that the seropositivity rate was 69% in animals with fertility problems and 44% in healthy-looking animals in the same herd (Gür and Doğan 2010). In a study conducted on the presence of BoHV4 in the abortion of dairy cattle using ELISA, it was determined that 29.3% of samples had BoHV-4 specific neutralizing antibodies (Yıldırım et al. 2011). Dağalp et al. (2012) in a study on the herpesviruses on the occurrence of reproductive disorders in dairy cattle herds in Turkey, detected BoHV-4 nucleic acid in the samples of leukocytes, vaginal swabs, and abortion materials by PCR technique as 26.1% and 33.6% in vaginal swab and leukocyte samples, respectively. In a study conducted in Kars province, 48 abortion materials were tested for the presence of BoHV-4 nucleic acid, and as a result, BoHV-4 could not be detected in any sample (Yilmaz et al. 2016). Similarly, in a study conducted to investigate the role of herpesviruses and pestiviruses in ruminant abortion cases in the Marmara region of Turkey using a PCR assay, no BoHV-4 was found in any of the tested samples from 81 aborted fetuses (Tuncer Göktuna et al. 2016). Furthermore, in another study (Aslan et al. 2015) of BVDV, BoHV-1, BoHV-4, and BoHV-5 infections in cows in Ankara, Çorum, Kırıkkale, and Yozgat provinces, the seropositivity rate for BoHV-4 was 28.78% and BoHV-4 genome was not detected by PCR in seropositive blood samples. In a recent study, Bilge Dağalp et al. (2020)

molecularly investigated the etiological role of BoHV-4 in cows with fertility problems, and the positivity rate was reported as 65.7%.

In the current study, the presence of BoHV-4 infection on 115 animal specimens was analyzed by PCR and no positivity was found. The results of this study are similar to those of studies by Aslan et al. (2015), Tuncer Göktuna et al. (2016), and Yilmaz et al. (2016). According to study reports, the age of the animal considerably affects the seroprevalence, it increases after 2-3 years of age. In a study in Turkey related to it, while the seroprevalence of infection was determined as 42% in animals before the age of 2 years, it was reported that it was 62% in animals older than 2 years (Bilge Dağalp et al. 2007). The majority of the animals sampled within the study are 2-3 years old.

As a result, no co-infection was identified among the animal samples of the above-mentioned infections. It is clear that our findings support the above-mentioned similar studies describing the presence of BoHV-1, BoHV-4 and BVDV nucleic acids in cattle in Turkey. The most important outcome of our study has been to demonstrate the role of BVDV infection in abortion cases in cattle in Van province for the first time. In addition to the high prevalence of the BVDV genome in abortion cases, this indicates a causal relation between BVDV and fertility problems such as abortion, birth with unviable calves in cattle and the existence of persistently infected (PI) animals in Van province.

In conclusion, we consider that BVDV alone or in association with other pathogens such as bacteria, fungi, parasites, and metabolic factors contributed to the development of abortion problems. Based on these data; cases of viral abortions caused or contributed by BVDV, BoHV-1, and BoHV-4 infections are common in Turkey, and sanitation measures are difficult to implement in publicly owned enterprises in rural areas. Therefore, the most effective way to control viral persistent infections such as pestiviruses and herpesviruses may be the detection of PI animals and vaccination of the susceptible population. It is necessary to conduct additional studies using epidemiological data from BVDV, BoHV-1, and BoHV-4 infections as well as molecular characterization of field viruses in various clinical cases in order to understand their responsibility for the economic losses in cattle husbandry in Turkey.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study was produced from the first author's master thesis titled "The Investigation of BVDV, BoHV-1 and BoHV-4 Infections abortion cases in cattle in Van District".

This work financially was supported by the scientific research projects coordination unit of Van Yuzuncu Yil University with Project ID: TYL-2020-8926.

The study was approved by the Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Local Ethics Committee (Approval date: 26/03/2020, Decision no: 2020/03).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: ARB

Supervision / Consultancy: ARB

Data Collection and / or Processing: HY

Analysis and / or Interpretation: HY

Writing the Article: ARB, HY


Critical Review: ARB

REFERENCES

- Ackermann M, Engels M (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol*, 113 (3-4), 293-302.
- Aldemir C, Başbuğ O (2019). Investigation of the Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Calves in Malatya Province. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 33 (3), 151-153.
- Alkan F, Burgu İ, Bilge Dağalp S et al. (2005). The seroprevalence of BHV-1 infection on selected dairy cattle herds in Turkey. *Rev Med Vet*, 156, 166-169.
- Altun S, Özdemir S, Sağlam YS (2019). The Presence and Prevalence of Bovine Parainfluenza 3 (BPIV-3), Bovine Papillomaviruses (BPV), Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) in Subclinical Mastitis in Cattle. *Kocatepe Vet J*, 12 (2), 135-143.
- Aslan ME, Azkur AK and Gazvancı S (2015). Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci*, 77 (11), 1371-1377.
- Baker JC (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 425-449.
- Bilge Dağalp S, Demir AB, Güngör E, Alkan F (2007). The Seroprevalence of Bovine Herpesvirus Type-4 (BoHV-4) Infection in Dairy Herds in Turkey and Possible Infection with Reproductive Disorders. *Revue Vet Med*, 04, 201-205.
- Bilge Dağalp S, Güngör E, Demir AB et al. (2010). The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57 (2), 87-91.
- Bilge Dağalp S, Babaoglu AR, Firat D et al. (2020). An assessment of bovine herpes virus 4 as a causative agent in abortions and neonatal death. *Onderstepoort J Vet Res*, 87 (1), 1-5.
- Bilgili İ, Mamak N (2019). Serological Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Isparta Province. *MAKU J Health Sci Inst*, 7 (2), 105-113.
- Burgu İ, Alkan F, Özkul A et al. (2003). Control and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection for dairy herds in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 127-133.
- Chastant-Maillard S (2015). Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg Dis*, 62 (3), 245-251.
- Cowley DB, Graham DA, Guelbenzu M et al. (2014). Aspects of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus herd-level seroprevalence and vaccination in dairy and beef herds in Northern Ireland. *Ir Vet J*, 67 (1), 1-5.
- Dağalp S, Alkan F, Çalışkan E et al. (2012). The investigation of the herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) on the occurrence of the reproductive disorders in dairy cattle herds Turkey. *Revue Med Vet*, 163 (4), 206-211.
- Doğan F, Bilge Dağalp S (2017). The Etiyopatogenesis of Viral Abortion Cases in Cattle. *MAKU J Health Sci Inst*, 5 (1), 66-77.
- Demirsoy A, Mamak N (2020). Serological Research of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Cattle Farms in Antalya Province. *MAKU J Health Sci Inst*, 8 (3), 128-137.
- Denise Goens S (2002). The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can Vet J*, 43 (12), 946.
- Gür S, Acar A, Gencay A et al. (2019). A Serological Investigation for Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infection in Aegean Region. *MAKU J Health Sci Inst*, 4 (1), 1-10.
- Gür S, Doğan N (2010). The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim Sci J*, 81 (3), 304-308.
- Gürçay M, Keçeci H, Öztürk M (2020). Determination of presence and prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus infection in cattle herds in Bingöl province. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 31 (1), 34-38.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2012). Virus Taxonomy, Family-Herpesviridae. Ninth report, pp 111-122.
- İnce ÖB (2020). Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection Epidemiology at Dairies in the Province of Afyonkarahisar. *Van Vet J*, 31 (3), 122-126.
- Kadıroğlu B, Alpaya G, Yeşilbağ K (2020). Diyarbakır Bölgesindeki Ruminantlarda Solunum Sistemi Virüslerinin Seroprevalansı ve Pestivirus Varlığının Araştırılması. *J Res Vet Med*, 39 (1), 26-33.
- Kaur G, Chandra M (2016). Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1. Herpesviridae (pp. 219), IntechOpen.
- Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF (1991). Replication of bovine viral diarrhoeavirus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *The Vet Rec*, 128 (25), 587-590.
- Mohanty SB, Hammond RC, Lillie MG (1971). A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch Gesamte Virusforsch*, 33 (3), 394-5.
- Muykens B, Thiry J, Kirten P et al. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*, 38 (2), 181-209.
- Oğuejiofor CF, Thomas C, Cheng Z, Wathes DC (2019). Mechanisms linking bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Animal Health Res Rev*, 20 (1), 72-85.
- Oğuzoğlu TÇ, Muz D, Yılmaz V et al. (2012). Molecular Characteristics of Bovine Virus Diarrhoea Virus 1 Isolates from Turkey: Approaches for an Eradication Programme. *Transbound Emerg Dis*, 59 (4), 303-310.
- Öncül S, Meriç I, Korkut F (1964). First incidence of mucosal disease in Turkey observed among cattle at Lalahan Animal Breeding Research Institute: Clinical Aspects. *J Anim Breed Res Inst*, 4, 186-199.
- Özgünlük İ, Yıldırım Y (2017). A Serological Investigation on Bovine Herpes Virus Type 1 (BHV 1) and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infections in Cattle in Southeast Region of Turkey. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (2), 152-157.
- Schweizer M, Mätzener P, Pfaffen G et al. (2006). "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J Virol*, 80 (14), 6926-6935.
- Spilki FR, Esteves PA, Lima MD et al. (2004). Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2a (BoHV-1.2 a). *Pesq Vet Bras*, 24 (1), 43-49.
- Şevik M, Avcı O (2015). Molecular investigation of Bovine Herpesvirus Type 1 from aborted small ruminant foetuses. *Eurasian J Vet Sci*, 31 (1), 57-59.
- Timurkan MÖ, Aydın H (2019). Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 51 (7), 1953-1961.
- Thiry E, Dubuisson J, Bublot M et al. (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch Tierarzt Wochenschr*, 97 (2), 72-77.
- Tuncer-Göktuna P, Alpaya G, Öner EB, Yeşilbağ K (2016). The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 48 (5), 1021-1027.
- Van Engelenburg FA, Maes RK, Van Oirschot JT, Rijsewijk FA (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol*, 31 (12), 3129-3135.
- Van Schaik G, Schukken YH, Nielen M et al. (2001). Epidemiology: Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: A case-control study. *Vet Quart*, 23 (2), 71-76.
- Vilcek S, Herring AJ, Herring JA et al. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136 (3-4), 309-23.
- Wathes DC, Oğuejiofor CF, Thomas C, Cheng Z (2020). Importance of viral disease in dairy cow fertility. *Engineering*, 6 (1), 26-33.
- Wellenberg GJ, Verstraten ERAM, Bela'k S et al. (2001) Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods*, 97 (1-2), 101-112.
- Yıldırım Y, Yılmaz V, Kalaycıoğlu AT et al. (2011). An investigation of A possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars district of Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 17 (6), 879-883.
- Yılmaz V (2015). Molecular Diagnosis and Seroepidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Cattle with Abortion Problem. *World J Vet Sci*, 3 (1), 3-6.
- Yılmaz V, Coskun N, Sahin M (2016). Molecular detection of Bovine Herpes Virus-1 (BoHV-1), Bovine Herpes Virus-4 (BoHV-4) and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in aborted ruminant fetuses from Kars province in Northeast Turkey. *Indian J Anim Res*, 50 (4), 551-556.
- Yılmaz V, Coskun N, Celebi O et al. (2017). Seroprevalence of Bovine Herpes Virus 1 (BoHV-1) in breeding bulls in Northeastern Anatolian Region of Turkey. *Indian J Anim Res*, 52 (2), 319-322.
- Yılmaz V, Coskun N, Kuru M, et al. (2020). Virological Investigation of Bovine Herpes Virus 1 and Bovine Herpes Virus 4 Infections in Cattle with Endometritis in Kars Province of Turkey. *Adv Anim Vet Sci*, 8 (5), 531-535.
- Zimmermann W, Broll H, Ehlers B et al. (2001). Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol*, 75 (3), 1186-1194.



Evaluation of Clinical Accuracy of Portable Glucometers in Sheep at the Beginning of the Breeding Season

Onur BAŞBUĞ^{1,*}  Abdurrahman TAKCI² 

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, 58140, Sivas, Turkey

² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, 58140, Sivas, Turkey

Received: 26.08.2022

Accepted: 08.11.2022

ABSTRACT

Measurements of blood glucose concentrations are frequently used to diagnose and monitor diseases in sheep. Portable blood glucometers are widely used in human medicine because of their practicality. However, there are not enough studies on the accuracy of these devices in sheep. In this study, it was aimed to determine the changes in the measurement values of two different portable blood glucometers and biochemistry autoanalyzer devices. The study was carried out on a total of 47 Kangal sheep, 17-18 months old, healthy and sick. According to the clinical examination, 35 healthy sheep (Group 1) and 12 patients whose hematocrit and total protein values were higher than the reference values were included in the study (Group 2). Glucose concentrations measured with portable glucometers were compared with the result obtained using the biochemistry autoanalyzer device. The agreement between the measured values was evaluated by Pearson correlation analysis and Bland-Altman plots. In addition, Tukey's test was performed to evaluate glucose measurement between groups. In the study found that there were -3.63% and 6.83% differences in the blood glucose measurement readings between the Optium Xceed (OX), On Call Pluss (CP), and biochemistry autoanalyzer devices in Group 1. These figures were found to be 6.08% and 9.66% in Group 2. The variety of measurement differences between the biochemistry autoanalyzer and glucometers should therefore be known in the clinical evaluation of blood glucose levels.

Keywords: Glucometer, Glucose, Hematocrit, Sheep.

ÖZ

Üreme Sezonu Başlangıcında Koyunlarda Portatif Şeker Ölçüm Cihazlarının Klinik Doğruluğunun Değerlendirilmesi

Koyunlarda hastalıkların tanısını koymak ve takibini izlemek için sıklıkla kan glikoz konsantrasyonlarının ölçümlerinden yararlanılmaktadır. Taşınabilir kan glukometreler beşerî hekimlikte pratiklikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu cihazların koyunlarda doğruluğu üzerine yeterli sayıda çalışma yoktur. Bu çalışmada iki farklı taşınabilir kan glukometre ile biyokimya otoanalizör cihazı ölçüm değerlerinin değişimlerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma 17-18 aylık sağlıklı ve hasta olmak üzere toplam 47 kangal ırkı koyun üzerinde gerçekleştirildi. Yapılan klinik muayene göre 35 sağlıklı koyun (kontrol grubu) ile hematokrit ve total protein değerlerinin referans değerleri dışında yüksek olan 12 hasta koyun çalışmaya dâhil edildi (hasta grubu). Taşınabilir glukometreler ile ölçülen glikoz konsantrasyonları, biyokimya otoanalizör cihazı kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Ölçülen değerler arasındaki uyum Pearson korelasyon analizi ve Bland-Altman grafikleri ile değerlendirildi. Ayrıca gruplar arasındaki glikoz ölçümünü değerlendirmek için Tukey testi yapıldı. Çalışmada Grup 1'de Optium Xceed (OX), On Call Pluss (CP) ve biyokimya otoanalizör cihazları arasındaki kan glukoz ölçüm değerlerinin değişimleri sırasıyla, -3.63% ve 6.83% olarak belirlendi. Grup 2 'de ise bu değerler 6.08%, 9.66% olarak saptanmıştır. Sonuç olarak; Klinik olarak kan glikoz seviyelerinin değerlendirilmesinde, biyokimya otoanalizör ile glukometrelerin arasındaki ölçüm farklarının değişimleri bilinmelidir.

Anahtar Kelimeler: Glikoz, Glukometre, Hematokrit, Koyun.

INTRODUCTION

Portable glucometers have started to be widely used in the field of medicine due to their practicality. However, the reliability of these devices is a matter of debate and clinical

studies are required for their safety. In veterinary practice, blood glucose concentration measurements are frequently used to diagnose and monitor certain diseases (Cohen et al. 2009; Tauk et al. 2015; Renaud et al. 2022). Glucose



monitoring is necessary to determine some diseases such as pregnancy toxemia, which is frequently encountered in sheep, and to establish a blood glucose curve. Especially in the diagnosis of pregnancy, early diagnosis and taking necessary precautions are important to prevent loss of mother and offspring (Kabakci et al. 2003; Brozos et al. 2011; Aly and Elshahawy 2016).

In practice, a biochemistry autoanalyzer is needed for the measurement of blood glucose concentration in the field of medicine. However, continuous application of this method is impractical in field conditions due to the difficulty of animal transport or the need for equipped laboratories for the examination of blood samples. Portable glucometers are devices used to quickly and easily measure blood glucose concentration. In herd health, blood glucose levels are evaluated to monitor lactating sheep, monitor the condition of critically ill patients, and plan short-term treatment strategies (Wiedmeyer et al. 2005; Mair et al. 2016; Ekici et al. 2021).

The aim of this study is to compare the results of blood glucose concentrations obtained by using 2 portable glucometers with the biochemistry autoanalyzer device. In addition, it is to reveal the changes in these devices of animals whose total protein and hematocrit levels are outside the reference values.

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was approved by the Sivas Cumhuriyet University Ethics Committee (Approval No: 2022/534).

This study was carried out a total of 200 head, 17-18 months old healthy and patient Kangal sheep before the breeding season. According to the clinical examination, 35 healthy sheep (Group 1) and 12 patient sheep were included in the study. It was determined that hematocrit (PCV) and total protein (TP) values of all sheep in the patient group were outside the reference values.

Group 1 Healthy group, hematocrit (27-45%), total protein (6.0-7.9 g/dL)

Group 2 Patient group, hematocrit (>45%), total protein (>8 g/dL)

After systematic clinical examination of all animals used in the study, hematocrit measurements were measured with microhematocrit tubes (3 min centrifugation at 11,800 x g in a micro-hematocrit centrifuge). Blood samples were taken from Vena Jugularis of the sheep included in the study using a 2.5 mL plastic syringe. The measurements of fresh blood samples were made in portable glucometer devices AbbottOptium Xceed, (USA) and On Call Pluss (German). The blood sample without anticoagulant was taken into sterile plastic tubes and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Glucose, total protein and triglyceride measurements were made from the obtained serum samples using a biochemistry autoanalyzer in fresh blood (Mindray BS-200, PRC).

Statistical Analysis

Shapiro Wilk-Smirnov was used to assess the study's numerical data's distribution. The glucose concentrations evaluated within the parameters of the study were found to have a normal distribution. The difference between groups was determined using One-way ANOVA and Tukey post hoc test. The agreement between glucose levels obtained by various devices was assessed using Bland-Altman plots and Pearson correlation analysis. The computations were performed using the statistical

package program SPSS (ver. 15). The statistical significance level for the calculation was taken as $p < 0.05$.

RESULTS

This study was conducted among 47 sheep, 17-18 months old, 42-46 kg in weight, and body condition score (BCS) in the range of 3-3.5, with glucose concentrations between 40-93 mg/dL.

The sheep included in the study were divided into 2 different groups according to their total protein and hematocrit values. Animals in Group 1 whose total protein and hematocrit values were within the reference range were included (PVC 27-47%, total protein 6.0-7.9 g/dL). Sheep included in Group 2 were accepted as those outside the reference values (Frye et al. 2022).

Table 1 show the mean glucose values measured with OX, CP and Biochemistry autoanalyzer in sheep, minimum-maximum values, and the importance of the differences between the groups. In the study, it was determined that there were statistically insignificant differences between the measurements of the OX portable device and the biochemistry autoanalyzer device in Group 1 and Group 2 (Table 1).

Table 2 shows the correlation values of glucose values measured with OX, CP, and Biochemistry autoanalyzer. It was determined that there was a 0.714 correlation between glucose values measured in OX and biochemistry autoanalyzer.

Bland-Altman method was applied to evaluate the relationship between the results of glucose concentrations measured in OX, CP and biochemistry autoanalyzer device. The evaluation results for each sample of the two measurement methods are shown in Figure 1-4. In this study, the difference between the accuracy of the OX and the CP blood glucose meter and the biochemistry autoanalyzer device was determined as -3.63% (Figure 1) and 6.83% in group 1 animals, (Figure 2) respectively. Among group 2 animals, 6.08% (figure) and 9.66% (figure 4) were detected. In figure 4, it was determined that the greatest difference was between the values measured on the CP and the biochemistry autoanalyzer between Group 2 animals. It was determined that the least difference was between OX and biochemistry autoanalyzer devices in the Group 1.

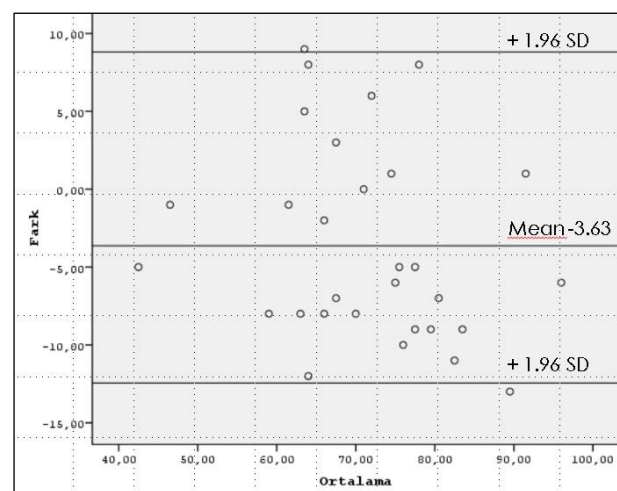


Figure 1. Bland-Altman Plot for Comparison of Optium Xceed and Biochemistry Autoanalyzer Measurement Techniques for Group.

Table 1. Glucose Means, Minimum-Maximum Values and Significance of Differences Between Groups in Healthy Sheep (Group I).

| Glucose (mg/dL) | Optium Xceed $\bar{x} \pm S\bar{x}$ | On Call Pluss $\bar{x} \pm S\bar{x}$ | Biochemistry autoanalyzer $\bar{x} \pm S\bar{x}$ | p |
|-----------------|--|---|---|-------|
| Group I | 73.30±12.89 ^a (45-99) | 62.83±13.82 ^b (34-99) | 68.60±11.51 ^{ab} (40-93) | 0.007 |
| Group II | 74.58±9.59 ^a (55-85) | 58.83±13.39 ^b (45-95) | 64.92±10.04 ^a (44-78) | 0.006 |

- : p>0.05 * p<0.05 ** : p<0.01 *** : p<0.001, a, b: Differences between group means containing different letters of the same column are significant (p<0.05).

Table 2. Correlation of Glucose Levels Between Optium Xceed, On Call Pluss and Biochemistry Autoanalyzer Devices.

| | Optium Xceed | On Call Pluss | Biochemistry Autoanalyzer |
|---------------|--------------|---------------|---------------------------|
| Optium Xceed | - | .695** | .871** |
| On Call Pluss | .695** | - | .660** |

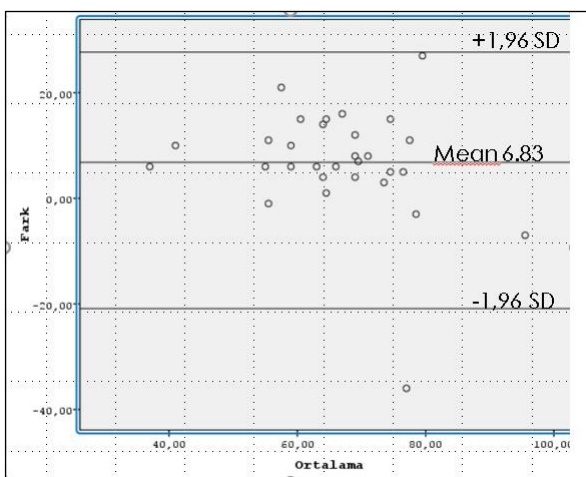


Figure 2. Bland-Altman Plot for Comparison of On Call Pluss and Biochemistry Autoanalyzer Measurement Techniques for Group 1.

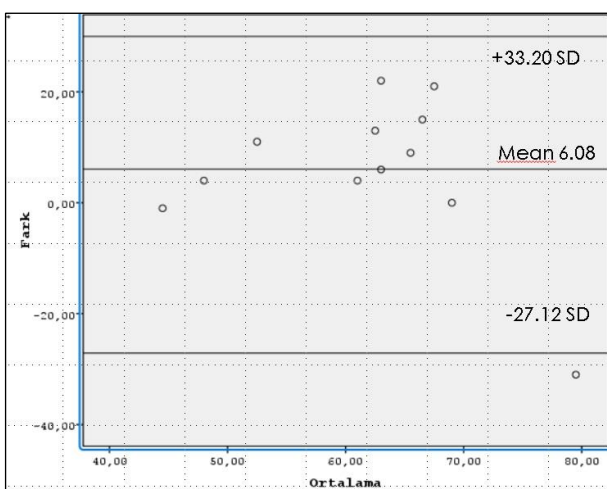


Figure 3. Bland-Altman Plot for Comparison of Optium Xceed and Biochemistry Autoanalyzer Measurement Techniques for Group 2.

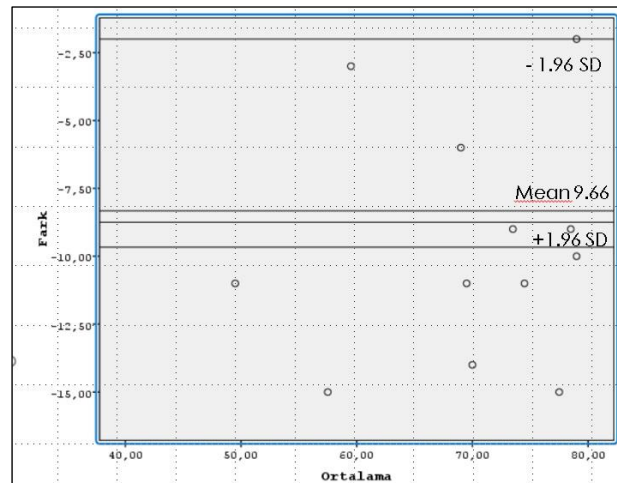


Figure 4. Bland-Altman Plot for Comparison of On Call Pluss and Biochemistry Autoanalyzer Measurement Techniques for Group 2.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Glucometers are widely used in human medicine because they provide fast results (Karon et al. 2008). Diagnostic parameters that are suitable for animal species, reliable and can give fast results are extremely important in the field of veterinary medicine. Evaluation of glucose levels in sheep health plays an important role in clinical intervention and patient follow-up. Therefore, it is important that glucometer readings are accurate and precise. Failure to do so can lead to critical medical errors (Kabakci et al. 2003; Cohen et al. 2009; Tauk et al. 2015; Renaud et al. 2022).

Numerous factors have been tested in different studies that could potentially affect the accuracy of measurements obtained with portable blood glucose devices, including sample volume, PCV, source of blood (venous, arterial or capillary blood), hemolysis of blood samples, blood temperature, environmental factors (Devreese and Leroux 1993; Arens et al. 1998; Ginsberg 2009) Considering these data, in this study, animals were divided into 2 groups as those within reference limits and those with high PCV and TP values. Blood samples with hemolysis in all groups were not included in the study and all samples were provided under the same environmental conditions.

In some studies, it has been shown that high PCV may cause erroneous blood glucose readings, and there may be more pronounced errors in the presence of hyperglycemia (Tang et al. 2000; Lane et al. 2015). Its effects on glucose and hematocrit measurements have been expressed in different studies (Karon et al.2008; Paul et al.2011; Lane et al. 2015). It has been reported that when lipid and protein levels are at high limits, it can cause changes in the liquid

part of the blood, thus causing measurement errors in the test strip of the glucometer (Ginsberg 2009).

In this study, the accuracy of 2 portable blood glucose meters was evaluated by comparing the differences between the values obtained using the spectrophotometric method in the biochemistry autoanalyzer device. In addition, in sheep with high PCV and TP concentrations, the comparison of portable blood glucose devices with a biochemistry autoanalyzer was shown in the study. In the study, although there were insignificant differences between the glucose levels measured with 2 glucometers and the biochemistry autoanalyzer device in both groups, significant changes were determined between the glucometers at the rate of $p=0.007$. In addition, the highest level of correlation (0.871) was found between the biochemistry autoanalyzer and the OX glucometer.

The compatibility of the measurements of different devices with other reported devices is evaluated by method comparison methods. In this context, taking into account the distribution of the data of different devices, Pearson's correlation analysis for dependent groups and Bland-Altman method are statistical methods that are frequently used to determine the consistency between measurement techniques (Van Stralen et al. 2008; Giavarina 2015; Aykal et al. 2016).

A popular statistical method for contrasting the medical approach is the Bland-Altman Method. The first step in these comparisons is to create a scatterplot showing the discrepancies between the measured values' means. Measurement errors are included in the means versus differences plot for the data points. It enables the investigation of any potential connections between If the differences are normally distributed, it is predicted that 95% of them would fall between "-1.96sd and +1.96sd" and that they will be randomly dispersed around zero. The Bland-Altman analysis objectively reveals the evaluation of different methods or tests and leaves the evaluation of the acceptability level of the differences to the interpretation of the physician (Bland and Altman 1999; Eren et al. 2013). In this study, the difference between the accuracy of the OX and the CP blood glucose meter and the biochemistry autoanalyzer device was determined as -3.63% and 6.83% in group 1 animals, respectively (Figure 1-2). Among group 2 animals, 6.08% and 9.66% were detected (Figure 3-4). When the Bland-Altman analysis and correlation results are evaluated, it shows parallelism with the analytical performance of the devices used in glucose concentration measurement with different methods used in the study. Correlation coefficients (r) values in the range of 0.70-0.89 are expressed as high correlation (Johnson et al. 2009; Domori et al. 2014). In the study, the r value of 0.871 between the OX and the biochemistry analyzer device shows that there is a high correlation between the two devices.

The results of this study show that; The difference between the accuracy of the OX and CP blood glucose meter and the biochemistry autoanalyzer device for glucose levels in sheep before the breeding season is within acceptable limits. However, we still think that it would be beneficial for clinicians to evaluate the differences between these groups in terms of both the follow-up and treatment of patients.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study was carried out in SIVKOÇ Ltd. Şti., affiliated to Sivas Cumhuriyet University. We thank them.

The study protocol was approved by the Sivas Cumhuriyet University Ethics Committee (Approval No: 2022/534).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: OB

Supervision / Consultancy: OB

Data Collection and / or Processing: OB, AT

Analysis and / or Interpretation: OB

Writing the Article: OB

Critical Review: AT

REFERENCES

- Aly M, Elshahawy I (2016). Clinico-biochemical diagnosis of pregnancy toxemia in ewes with special reference to novel biomarkers. *Alex J Vet Sci*, 48 (2), 96-102.
- Arens S, Moons V, Meuleman P et al. (1998). Evaluation of Glucocard Memory 2 and Accutrend sensor blood glucose meters. *Clin Chem Lab Med*, 36 (1), 47-52.
- Aykal G, Erkal FA, Yeğin A, Eren E, Yılmaz N (2016). HbA2 ölçümü için BioRad D-10TM ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 73 (3), 245-252.
- Bland JM, Altman DG (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*, 8 (2), 135-160.
- Brozos, C, Mavrogianni VS, Fthenakis GC (2011). Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 27 (1), 105-113.
- Cohen TA, Nelson RW, Kass PH et al. (2009). Evaluation of six portable blood glucose meters for measuring blood glucose concentration in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 235 (3), 276-280.
- Devreese K, Leroux-Roels G (1993). Laboratory assessment of five glucose meters designed for self-monitoring of blood glucose concentration. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 31 (12), 829-837.
- Domori A, Sunahara A, Tateno M et al. (2014). The clinical utility of two human portable blood glucose meters in canine and feline practice. *Vet Clin Pathol*, 43 (1), 55-62.
- Ekici M, Takcı A, Kıvrak MB (2021). Comparison of some hematological and serum biochemical variables in Kangal Akkaraman, Texel and İle De France ewes in lactation period within Sivas province. *Eurasian J Vet Sci*, 37 (4), 296-302.
- Eren SE, Çaycı B, Atikeler G et al. (2013). Koagülasyon Cihazı Değişiminde Karşılaştırılan Hasta Sonuçları. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 11 (1), 7-14.
- Frye EA, Behling-Kelly EL, Lejuene M, Webb JL (2022). Complete blood count and biochemistry reference intervals for healthy adult sheep in the northeastern United States. *Vet Clin Path*, 51 (1), 119-125.
- Giavarina, D (2015). Understanding bland altman analysis. *Biochem Med*, 25 (2), 141-151.
- Ginsberg BH (2009). Factors affecting blood glucose monitoring: sources of errors in measurement. *J Diabetes Sci Technol*, 3 (4), 903-913.
- Johnson BM, Fry MM, Flatland B, Kirk CA (2009). Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 235 (11), 1309-1313.
- Kabakci, N, Yarim G, Yarim M et al. (2003). Pathological, clinical and biochemical investigation of naturally occurring pregnancy toxemia of sheep. *Acta Vet*, 53 (2-3), 161-169.
- Karon BS, Griesmann L, Scott R et al. (2008). Evaluation of the impact of hematocrit and other interference on the accuracy of hospitalbased glucose meters. *Diabetes Technol Ther*, 10 (2), 111-120.
- Lane SL, Koenig A, Brainard BM (2015). Formulation and validation of a predictive model to correct blood glucose concentrations obtained with a veterinary point-of-care glucometer in hemodiluted and hemoconcentrated canine blood samples. *J Am Vet Med Assoc*, 246, 307-312.
- Mair B, Drillich M, Klein-Jöbstl D, et al. (2016). Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. *BMC Vet Res*, 12 (1), 1-11.

- Paul AE, Shiel RE, Juvet F, Mooney CT, Mansfield CS (2011).** Effect of hematocrit on accuracy of two point-of-care glucometers for use in dogs. *Am J Vet Res*, 72 (9), 1204- 1208.
- Renaud DL, Hare KS, Wood KM, Steele MA, Cantor MC (2022).** Evaluation of a point-of-care meter for measuring glucose concentrations in dairy calves: A diagnostic accuracy study. *JDS Communications*, 3 (4), 301-306.
- Tang Z, Lee JH, Louie RF, Kost GJ (2000).** Effects of different hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing. *Arch Pathol Lab Med*, 124 (8), 1135-1140.

- Tauk BS, Drobatz KJ, Wallace KA, Hess RS (2015).** Correlation between glucose concentrations in serum, plasma, and whole blood measured by a point-of-care glucometer and serum glucose concentration measured by an automated biochemical analyzer for canine and feline blood samples. *J Am Vet Med Assoc*, 246 (12), 1327-1333.
- Van Stralen KJ, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW (2008).** Agreement between methods. *Kidney Int*, 74 (9), 1116-1120.
- Wiedmeyer CE, Johnson PJ, Cohn LA et al. (2005).** Evaluation of a continuous glucose monitoring system for use in veterinary medicine. *Diabetes Technol Ther*, 7 (6), 885-895.



Investigation of The Effect of Artemisinin Administration on Total Oxidant/Antioxidant and Oxidative Stress-Index in The Liver and Kidney Tissue of Pentylene-tetrazole-Induced Mice

Yılmaz KOÇAK*^{1b}

Department of Physical therapy and rehabilitation, Faculty of Health Sciences, Van Yuzuncu Yil University, 65040, Van, Turkey

Received: 06.09.2022

Accepted: 14.11.2022

ABSTRACT

This study was designed to investigate the changes in total oxidant (TOS)/antioxidant (TAS) and oxidative stress index (OSI) levels in liver and kidney tissues of mice pre-treatment of artemisinin against oxidative stress that may occur in mice administered pentylene-tetrazole (PTZ). Swiss albino mice (Male) (n=42) were used in the study. The mice were divided into six groups and each group had seven animals (n=7): (1) Control (C) /saline Group, (2) PTZ (35 mg/kg) Group, (3) Valproate (VPA) (100 mg/kg) + PTZ Group, (4) Artemisinin (ART) (30 mg/kg) + PTZ Group, (5) ART (60 mg/kg) + PTZ Group, (6) ART (120 mg/kg) + PTZ Group. Mice received injections intraperitoneally (ip). After the treatments, the animals were observed for seizures for 30 minutes. On the last day (day 26) of the experiment, the PTZ loading dose (75 mg/kg) was administered to the mice and then the animals were sacrificed. TAS, TOS and OSI levels were measured in liver and kidney tissue. PTZ increased TOS and decreased TAS in liver and kidney tissue. ART significantly increased TAS and decreased TOS in liver tissue at increasing doses ($p<0.05$). ART was not very effective in kidney tissue. However, TAS levels in kidney tissue were significantly higher when VPA was compared with other groups ($p<0.05$). In this study, it can be assumed that PTZ-induced oxidative stress may be due to the activation of glutamate receptors in peripheral tissues. ART may have a protective effect against liver damage due to PTZ-induced oxidative stress and hypoxia. This effect may be due to the antioxidant capacity of ART.

Keywords: Artemisinin, Kidney, Liver, Oxidative stress, Pentylene-tetrazol.

öz

Artemisinin Uygulamasının, Pentilentetrazol ile İndüklenen Farelerin Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Total Oksidan/Antioksidan ve Oksidatif Stres İndeksi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Bu çalışma, pentilentetrazol (PTZ) uygulanan farelerde oluşabilecek oksidatif strese karşı artemisinin ön tedavisinin farelerin karaciğer ve böbrek dokularında toplam oksidan (TOS)/antioksidan (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) düzeylerindeki değişiklikleri araştırmak için tasarlanmıştır. Çalışmada İsviçre albino fareleri (Erkek) (n=42) kullanıldı. Fareler altı gruba ayrıldı ve her grupta yedi hayvan (n=7) vardı: (1) Kontrol (C) /salin Grubu, (2) PTZ (35 mg/kg.) Grubu, (3) Valproat (VPA) (100 mg/kg) + PTZ Grubu, (4) Artemisinin (ART) (30 mg/kg) + PTZ Grubu, (5) ART (60 mg/kg) + PTZ Grubu, (6) ART (120 mg/kg) + PTZ Grubu. Fareler, intraperitoneal (ip) olarak enjeksiyonlar uygulandı. Uygulamalardan sonra hayvanlar 30 dakika boyunca nöbetler için gözlemlendi. Deneyin son gününde (26. gün) farelere PTZ yükleme dozu (75 mg/kg) uygulandı ve ardından hayvanlar sakrifiye edildi. Karaciğer ve böbrek dokusunda TAS, TOS ve OSI düzeyleri ölçüldü. PTZ, karaciğer ve böbrek dokusunda TOS'u artırdı ve TAS'ı azalttı. ART, artan dozlarda karaciğer dokusunda TAS'ı önemli ölçüde artırdı ve TOS'u azalttı ($p<0.05$). ART böbrek dokusunda çok etkili değildi. Ancak böbrek dokusundaki TAS düzeyleri VPA diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Bu çalışmada, PTZ kaynaklı oksidatif stresin, periferik dokularda glutamat reseptörlerinin aktivasyonundan kaynaklanabileceği varsayılabilir. ART, PTZ'nin neden olduğu oksidatif stres ve hipoksiye bağlı karaciğer hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilir. Bu etki, ART'nin antioksidan kapasitesine bağlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Artemisinin, Böbrek, Karaciğer, Oksidatif stres, Pentilentetrazol.



INTRODUCTION

It is known that seizures due to epilepsy cause oxidative stress (OS) not only in the nervous system but also in other systems of the organism (Hamed 2017). OS is caused by the imbalance in the oxidant/antioxidant defense system of the organism as a result of the overproduction of free radicals (Demirci-Çekiç et al. 2022). This imbalance contributes to the formation of various diseases in the cardiovascular, digestive and nervous systems (Bhatti et al. 2022). Epilepsy is one of the neurodegenerative diseases that affect people worldwide. This disease can increase the formation of free radicals with recurrent seizures (Xu and Fan 2022). In addition, it has been reported that in epilepsy, prolonged and recurrent seizures may cause lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in peripheral organs such as the liver and kidney, which are sensitive to oxidative stress (Dillioglugil et al. 2010).

PTZ is a widely used agent to induce epilepsy-like tonic and clonic seizures in experimental animals (Goudarzi et al. 2020). In experimental studies using the PTZ model, it has been reported to increase oxidative stress in the brain (Li et al. 2021).

The liver and kidney are the detoxification organs of the organism (Ulus et al. 2020). They are tissues that protect the body from environmental toxins and various xenobiotics, including drugs. Therefore, they are organs sensitive to oxidative stress. The mechanism of epilepsy disease is not fully understood. However, the diagnosis of acute liver failure, which develops as a complication of grand mal seizures, is determined by the evaluation of neurological disorders and liver damage markers together. In addition, hypoxia and steatosis-related factors that may develop due to recurrent seizures in peripheral organs are also considered (Dillioglugil et al. 2010; Rodrigues et al. 2013).

ART, which is obtained from the plant *Artemisia annua*, is an agent used in the treatment of malaria worldwide (Dehkordi et al. 2019). It has also been shown to have anti-inflammatory, antibacterial, and anticancer effects. It has been reported that ART has an effect on the GABA receptor, which plays an important role in epilepsy, and is an NMDA receptor antagonist (Dehkordi et al. 2019; Kim et al. 2014; Kiss et al. 2021).

In this context, in this study, it was aimed to investigate the protective potential of ART in liver and kidney tissue against tissue damage that may occur due to oxidative stress that may occur in mice induced by PTZ.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by Van Yuzuncu Yil University (Turkey) Animal Researches Local Ethics Committee (YUHADYEK-28/07/2022-2022/07-14).

Animals and Experimental Design

In the experimental study, 42 Swiss albino mice were used. Mice were given access to standard pellet chow and water. mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle. Afterward, the experimental animals were randomly divided into six groups of seven animals each. The first group was given saline (0.9% NaCl ip), and the second group was given isotonic dissolved PTZ (35 mg/kg, ip). The third group was given the reference drug valproate (VPA) (100 mg/kg, ip). Artemisinin in different doses of 30, 60 and 120 mg/kg was administered to the fourth, fifth

and sixth groups. The last four groups (Groups 3,4,5,6) were injected with PTZ (35 mg/kg, ip) 30 minutes later.

Seizure Model

The PTZ-kindling epilepsy model was carried out with minor modifications to the method used by İlhan et al. (İlhan et al., 2005) Mice received a total of 11 injections of PTZ (35 mg/kg) every other day for 24 days. One hour before PTZ-treated, different doses of ART and VPA were administered. Mice were then observed for 30 minutes for tonic and clonic seizures. In addition, on the 26th day of this study, PTZ (75 mg/kg ip) dose was administered to the test groups (PTZ, VPA, ART). This dose is convulsion (clonic and tonic), status epilepticus and lethality dose (İlhan et al. 2005; Kiasalari et al. 2013). Following PTZ injection, for 30 minutes, the presence of seizures and lethality were evaluated, recorded and scored.

Obtaining Homogenate from Liver and Kidney Tissue Samples

Mice were sacrificed, and tissues were removed and washed with isotonic saline. Phosphate buffer (pH 7.4, 1.8 mL 50 mM) was added to liver and kidney tissues (200 mg). Homogenization was achieved with a homogenator device (Ultra Turrax-T25). The obtained homogenate was centrifuged at 10000 rpm for 30 minutes. The supernatants were then stored at -80 °C until the day of the study. Protein concentrations of tissues were determined by the method of Lowry et al. (1951).

TOS Measurement of Liver and Kidney Tissue

TOS level was measured in liver and kidney tissue homogenates using a commercial kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Turkey). Tissue TOS results were expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/gr protein (Erel 2005).

TAS Measurement of Liver and Kidney Tissue

TAS levels in liver and kidney tissue homogenates were measured using a commercial kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Turkey). Tissue TAS results were expressed as mmol Trolox equivalent/gr protein (Erel 2004).

OSI (Oxidative stress index) Measurement

OSI is calculated as a percentage of the ratio of TOS to TAS. To find the OSI values, the unit of TAS is converted to $\mu\text{mol/gr}$ protein. OSI levels were calculated according to the formula expressed below (Cikman et al. 2014).

$$\text{OSI} = (\text{TOS}, \mu \text{ mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/gr protein}) / (\text{TAS}, \mu \text{ mol Trolox equivalent/gr protein}) / 100$$

Statistical Analysis

Descriptive statistics were obtained for the groups used in the study. Data were expressed as Mean \pm SEM. A one-way ANOVA analysis of variance was used to compare the groups, followed by the Tukey post hoc test. SPSS (IBM SPSS for Windows, ver.24) program was used for the calculations.

RESULTS

In this study, the effects of artemisinin on the liver and kidney tissue in mice treated with PTZ were evaluated. The liver tissue TOS level of the PTZ group was found to be higher than all other groups ($p < 0.05$). The liver tissue TOS levels of the control (C) and ART-120 groups were similar ($P > 0.05$), and liver TOS levels were found to be significantly lower when these two groups were compared with the PTZ, VPA, ART-30 and ART-60 groups ($p < 0.05$). When the liver TOS level of the VPA group was compared with the ART-30 and ART-60 groups, there was no statistical significance ($p > 0.05$). The liver tissue results are

shown in figure 1. TOS levels in kidney tissue were high in PTZ and ART-120 groups ($p < 0.05$). Group C kidney tissue TOS level was lower than all other groups ($p < 0.05$). Among the ART groups, the lowest TOS level was found in the ART-30 dose ($p < 0.05$). The kidney tissue results are shown in figure 2. TAS levels of liver tissue are shown in figure 1. The liver TAS level of the PTZ group was found to be lower than the other groups ($p < 0.05$). The ART-120 group was found to be significantly higher than the other groups ($p < 0.05$). The liver TAS level of group C was similar to the ART-30 group, significantly higher when compared to the PTZ, VPA and ART-60 groups, and significantly lower compared to the ART-120 group ($p < 0.05$). Kidney tissue TAS levels of PTZ, ART-30 and ART-120 groups were found to be low ($p < 0.05$). TAS level of kidney tissue in the VPA group was found to be significantly higher than in all other groups. While the kidney tissue TAS level of the control group was significantly lower than the VPA group, it was found to be significantly higher than the PTZ, ART-30, ART-60 and ART-120 groups ($p < 0.05$, Figure 2).

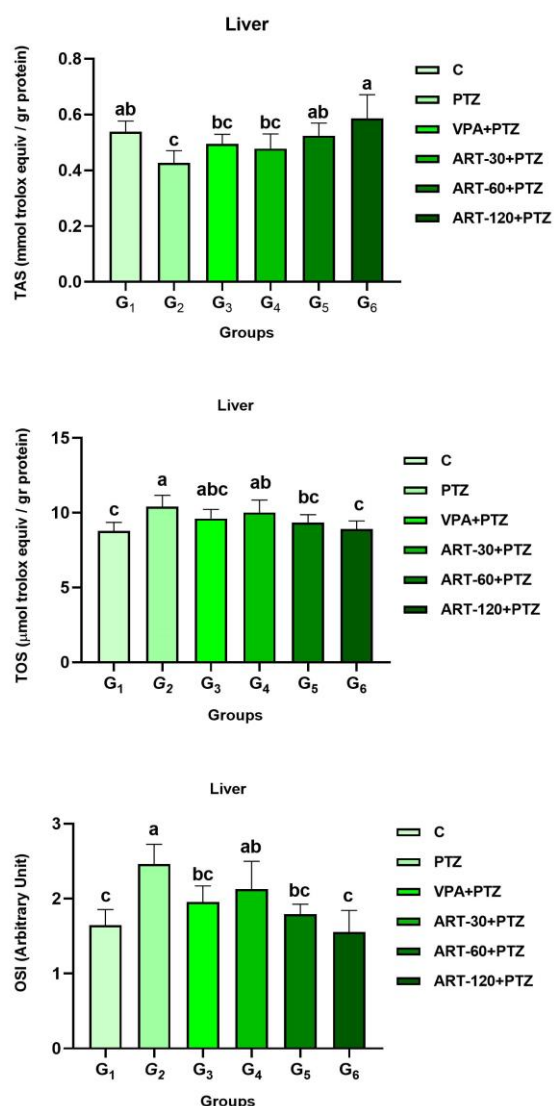


Figure 1. Comparison of the values of parameters measured in Liver homogenates. *Different letters in the same column represent statistical significance ($p < 0.05$). C: Control/saline, PTZ: pentylenetetrazol, VPA: Valproate, ART: artemisinin, TAS: Total antioxidant status, TOS: Total oxidant status, OSI: Oxidative stress index Values are mean \pm SD. n = 7 per group;

Liver tissue OSI value was higher in the PTZ group compared to all other groups. The lowest OSI value was found in the ART120 group and this value was found to be significantly lower when compared to the groups ($p < 0.05$). The OSI value of group C was found to be significantly higher than the ART120 group and significantly lower than the PTZ, VAR, ART30 and ART60 groups ($p < 0.05$, Figure 1). In kidney tissue, group C OSI value was found to be significantly lower when compared to all other groups. PTZ group OSI value was lower than all groups ($p < 0.05$, Figure 2).

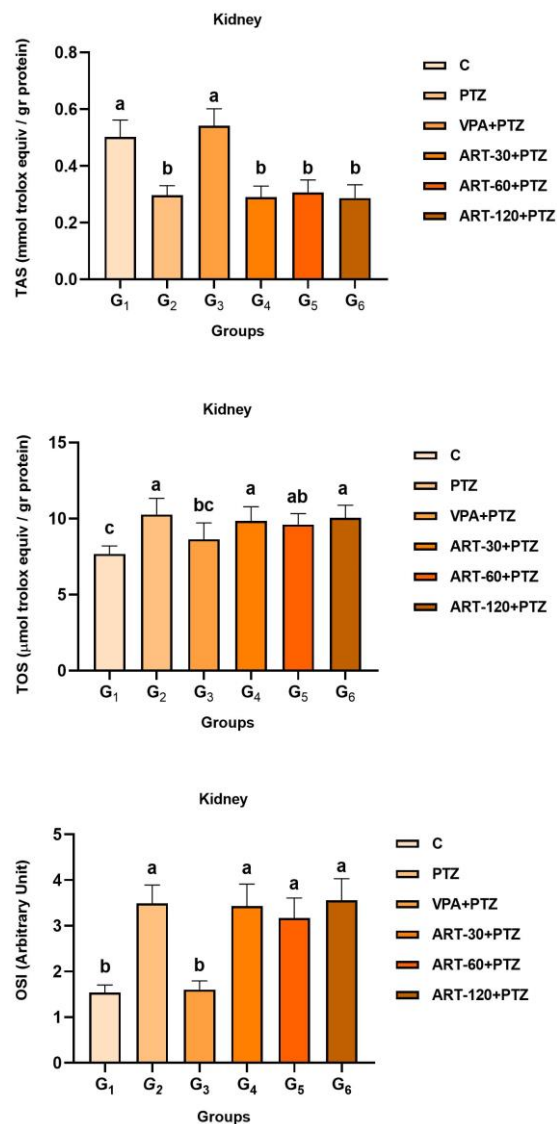


Figure 2. Comparison of the values of parameters measured in kidney homogenates. *Different letters in the same column represent statistical significance ($p < 0.05$). C: Control/saline, PTZ: pentylenetetrazol, VPA: Valproate, ART: artemisinin, TAS: Total antioxidant status, TOS: Total oxidant status, OSI: Oxidative stress index Values are mean \pm SD. n = 7 per group;

DISCUSSION AND CONCLUSION

Oxidative stress (OS) may occur due to an excessive increase in free radicals in the body or insufficiency of the antioxidant defense system (Buyukuslu and Yigitbasi 2015). OS causes DNA damage and lipid peroxidation in the cell. This may contribute to the formation of tissue

damage (Bulduk 2022; Kurt et al. 2022). OS has been suggested to trigger the occurrence of various diseases. One of these diseases is epilepsy. Researchers reported that OS increases epileptic seizures and decreases the antioxidant defense system. Also, free radical production can increase recurrent seizures (Akbas et al. 2005). These recurrent seizures can lead to lipid peroxidation and oxidant/antioxidant imbalance in hepatocyte cells in the liver. In addition, it may cause fulminant liver failure, one of the complications of epilepsy (Rodrigues et al. 2013). It has also been reported that long-term use of antiepileptic drugs may cause hepatotoxicity by increasing liver enzyme levels (Cengiz et al. 2000; Ichai et al. 2003). Experiment results found that TOS increased and consumed TAS in PTZ-administrated groups. It was observed that ART increased the TAS level with increasing doses. In particular, the high dose of ART was better than the control and reference drug groups. The data of this study are compatible with previous studies (Akbas et al. 2005; Dillioglugil et al. 2010; Obay et al. 2008; Rodrigues et al. 2013; Sudha et al. 2001). Researchers show in their studies that epilepsy disease can trigger stress in the liver. In a previous study, they suggested that liver damage may be caused by ischemia and hypoxia due to epileptic seizures (Decell et al. 1994). ART affected the OS stress parameters in liver tissue. It has been reported that ART suppresses apoptosis induced by anesthetic drugs (Xu et al. 2017). It has also been suggested that ART has a strong antioxidant capacity against OS that can be caused by free radicals (Ahmed-Laloui et al. 2022; Egwu et al. 2022). They hypothesized that oxidative stress in the liver in experimental epileptic seizures would be due to the activation of glutamate receptors (Akbas et al. 2005). Our results suggest that the effect of ART in the liver is either by reducing lipid peroxidation in hepatocyte cells or by inhibiting glutamate receptor activation.

Armağan et al. (2008) reported that PTZ administration increased lipid peroxidation and decreased antioxidant enzymes (SOD, CAT) in the kidney. Moreover, it has been reported that rats treated with PTZ have increased urea, creatinine, uric acid and cystatin c levels. In the same study, kidney DNA fragmentation and MDA levels increased with PTZ. They also suggested that total antioxidant capacity decreased (Tousson et al. 2019). In their study conducted by different research groups, they reported that PTZ administration increased lipid peroxidation in the kidney, but there was no change in endogenous antioxidant levels (Kapucu et al. 2021; Uma Devi et al. 2006). As a matter of fact, in our study, it was determined that TOS levels increased and TAS levels decreased in the kidneys of mice treated with PTZ. Our results were similar to the literature. In recent studies, it has been hypothesized that PTZ administration causes OS by activating glutamate receptors. It has been reported that these receptors may be the source of OS occurring in peripheral organs due to seizures (Kapucu et al. 2021; Lüttjohann et al. 2009). ART pretreatment did not significantly improve total oxidant/antioxidant levels in the kidneys of PTZ-treated mice. The moderate dose of ART showed a modest increase in antioxidant levels. It has been reported that ART has curative effects in studies on kidney disorders (Xia et al. 2020). It has been reported that ART used in the treatment of lupus nephritis improves the creatinine clearance rate (Lu 2002). It has been reported that ART used in the treatment of lupus nephritis improves the creatinine clearance rate. They also claimed to improve proteinuria and glomerular permeability (Jin et al. 2009). In light of the literature, it is seen that ART and

its derivatives have therapeutic effects on kidney tissue. However, in this study, it was determined that there was no significant curative effect against OS stress caused by PTZ in kidney tissue.

It was determined that PTZ increased the TOS level and decreased the TAS level in the liver and kidney tissues of the mice. ART pretreatment showed antioxidant properties by reducing oxidative stress in the liver. ART was less effective in kidney tissue. Although ART is currently used effectively against malaria, it may be useful in reducing oxidative stress in peripheral tissues that can be caused by epileptic seizures. Further experimental and clinical studies are needed to understand the mechanism of the beneficial effects of ART.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study was approved by Van Yuzuncu Yil University (Turkey) Animal Researches Local Ethics Committee (YUHADYK-28/07/2022-2022/07-14).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

REFERENCES

- Ahmed-Laloui H, Zaak H, Rahmani A, et al (2022). Assessment of artemisinin and antioxidant activities of three wild Artemisia species of Algeria. *Nat Prod Res*, 1-9.
- Akbas SH, Yegin A, Ozben T (2005). Effect of pentylene tetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem*, 38 (11), 1009-1014.
- Armağan A, Kutluhan S, Yılmaz M, et al (2008). Topiramate and Vitamin E Modulate Antioxidant Enzyme Activities, Nitric Oxide and Lipid Peroxidation Levels in Pentylene tetrazol-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103 (2), 166-170.
- Bhatti JS, Sehrawat A, Mishra J, et al (2022). Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radic Biol Med*, 184, 114-134.
- Bulduk B (2022). Effect of chitosan application on lung tissue in rats with experimental fluorine toxicity. *J Health Sci Med*, 5 (4), 969-972.
- Buyukuslu N, Yigitbasi T (2015). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity. *Clin Exp Health Sci*, 5 (3), 197.
- Cengiz M, Yüksel A, Seven M (2000). The Effects of Carbamazepin and Valporoic Acid on the Erythrocyte Glutathione, Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase and Serum Lipid Peroxidation in Epileptic Children. *Pharmacol Res*, 41 (4), 423-425.
- Cikman O, Ozkan A, Aras AB, et al (2014). Radioprotective effects of nigella sativa oil against oxidative stress in liver tissue of rats exposed to total head irradiation. *J Invest Surg*, 27 (5), 262-266.
- Decell MK, Gordon JB, Silver K, et al (1994). Fulminant hepatic failure associated with status epilepticus in children: Three cases and a review of potential mechanisms. *Intensive Care Med*, 20 (5), 375-378.
- Dehkordi FM, Kaboutari J, Zendehelel M, Javdani M (2019). The antinociceptive effect of artemisinin on the inflammatory pain and role of GABAergic and opioidergic systems. *Korean J Pain*, 32 (3), 160-167.
- Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, et al (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal*, 209, 114477.
- Dillioglugil MO, Kir HM, Demir C, et al (2010). Effect of pentylene tetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. *Brain Res Bull*, 83 (6), 356-359.
- Egwu CO, Pério P, Augereau JM, et al (2022). Resistance to artemisinin in falciparum malaria parasites: A redox-mediated phenomenon. *Free Radic Biol Med*, 179, 317-327.
- Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant

- response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 37 (2), 112-119.
- Erel O (2005)**. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38 (12), 1103-1111.
- Goudarzi R, Zamanian G, Partoazar A, et al (2020)**. Novel effect of Arthrocn (avocado/soy unsaponifiables) on pentylentetrazole-induced seizure threshold in mice: Role of GABAergic pathway. *Epilepsy Behav*, 104, 1-5.
- Hamed SA (2017)**. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 10 (9), 993-1006.
- Ichai P, Huguet E, Guettier C, et al (2003)**. Fulminant hepatitis after grand mal seizures: Mechanisms and role of liver transplantation. *Hepato*, 38 (2), 443-451.
- Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamish S, Iraz M (2005)**. Antiepileptogenic and antioxidant effects of Nigella sativa oil against pentylentetrazole-induced kindling in mice. *Neuropharm*, 49 (4), 456-464.
- Jin O, Zhang H, Gu Z, et al (2009)**. A Pilot Study of the Therapeutic Efficacy and Mechanism of Artesunate in the MRL/lpr Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Mol Immunol*, 6 (6), 461-467.
- Kapucu A, Kaptan Z, Akgun Dar K, kaleler İ, Üzüm G (2021)**. Effects of Erythropoietin Pretreatment on Liver, Kidney, Heart Tissue in Pentylentetrazole-Induced Seizures; Evaluation in Terms of Oxidative Markers, Prolidase and Sialic Acid. *J Ist Faculty Med*, 84 (4), 464-471.
- Kiasalari Z, Khalili M, Roghani M, Heidari H, Azizi Y (2013)**. Antiepileptic and Antioxidant Effect of Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa Foetida Gum on Pentylentetrazole-induced Kindling in Male Mice. *Basic Clin Neurosci*, 4 (4), 299-306.
- Kim W, Choi WJ, Lee S, et al (2014)**. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. *Korean J Physiol Pharmacol*, 19 (1), 21-27.
- Kiss E, Kins S, Zöller Y, et al (2021)**. Artesunate restores the levels of inhibitory synapse proteins and reduces amyloid- β and C-terminal fragments (CTFs) of the amyloid precursor protein in an AD-mouse model. *Mol Cell Neurosci*, 113, 103624.
- Kurt S, Eşki F, Mis L (2022)**. Monitoring of oxidative stress and TNF- α status during the healing process in hair goats with metritis. *TJVR*, 6 (1), 15-18.
- Li D, Bai X, Jiang Y, Cheng Y (2021)**. Butyrate alleviates PTZ-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuron apoptosis in mice via Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. *Brain Res Bull*, 168, 25-35.
- Lowry OH (1951)**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Lu L (2002)**. Study on effect of Cordyceps sinensis and artemisinin in preventing recurrence of lupus nephritis. *Chin J Integr Med*, 2 (3), 169-171.
- Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G (2009)**. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol & Behav*, 98 (5), 579-586.
- Obay BD, Taşdemir E, Tümer C, Bilgin HM (2008)**. Dose-dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides*, 29 (3), 448-455.
- Rodrigues AD, Scheffel TB, Scola G, et al (2013)**. Purple grape juices prevent pentylentetrazole-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. *Nutr Res*, 33 (2), 120-125.
- Sudha K, Rao AV, Rao A (2001)**. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta*, 303 (1-2), 19-24.
- Tousson E, Keshta ATH, Hussein Y, Fekry RM, Abo-Ghaneima WK (2019)**. Renal Protective Effect of Ginkgo biloba and L-carnitine Extracts against Pentylentetrazole Induced Toxicity, Oxidative Stress, Injury and Proliferation Alteration in Epileptic Rats. *Annu Rev Cancer Biol*, 32 (2), 1-13.
- Ulusu NN, Aydemir D, Oztasci B, Barlas N (2020)**. Influence of the butylparaben administration on the oxidative stress metabolism of liver, kidney and spleen. *Turk J Biochem*, 45 (6), 689-694.
- Uma Devi P, Kolappa Pillai K, Vohora D (2006)**. Modulation of pentylentetrazole-induced seizures and oxidative stress parameters by sodium valproate in the absence and presence of N-acetylcysteine. *Fundam Clin Pharmacol*, 20 (3), 247-253.
- Xia M, Liu D, Liu Y, Liu H (2006)**. The Therapeutic Effect of Artemisinin and Its Derivatives in Kidney Disease. *Front Pharmacol*, 11, 380.
- Xu G, Huang YL, Li P, Guo HM, Han XP (2017)**. Neuroprotective effects of artemisinin against isoflurane-induced cognitive impairments and neuronal cell death involve JNK/ERK1/2 signaling and improved hippocampal histone acetylation in neonatal rats. *J Pharm Pharmacol*, 69 (6), 684-697.
- Xu Y, Fan Q (2022)**. Relationship between chronic hypoxia and seizure susceptibility. *CNS Neurosci Ther*, 1-17.



The Effects of Bisphenol A on the Distribution and Heterogeneity of Mast Cells in Rat Digestive Tract

Halil Cumhur YILMAZ^{1,*} Mecit YÖRÜK¹

¹ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology, 65080, Van, Turkey

Received: 10.09.2022

Accepted: 06.11.2022

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a chemical component used in plastic products around the world. This study aims to examine the effects of these chemical compounds to which humans are frequently exposed in everyday life, on the heterogeneity and distribution of mast cells in the gastrointestinal system. For the study, 24 male Wistar albino rats were divided into 4 groups (control, sham, 25 mg/kg, and 50 mg/kg BPA treated). BPA was dissolved in corn oil and administration was done by oral gavage for thirty days. Gastrointestinal tissue samples taken from animals anesthetized with inhalation anesthesia were fixed using BLA (Basic Lead Acetate) and Carnoy fixation. Then, following routine tissue follow-up, they were blocked with Paraplast. Sections (6 µm) taken from the blocks were stained using Toluidine blue (TB) and Alcian blue-safranin O 8GX (AB-SO) combined dyes. Counting and statistical analysis of the mast cells in the TB-stained sections were performed. According to the results of the analysis, a higher number of mast cells was observed in the BLA fixation solution, while the increase in the number of mast cells was statistically significant in the groups treated with BPA ($p < 0.05$). In the combined AB-SO 8GX staining results, AB (+), S (+), and Mix (+) mastocytes were found in almost all sections of the digestive tract. As a result of this staining process, again, no difference was found in the semi-quantitative evaluations performed including the groups treated with BPA. Although BPA does not affect the heterogeneity of mast cells, it does affect their distribution. Therefore, it is assumed that further studies will need to be carried out.

Keywords: Bisphenol A, Gastrointestinal tract, Heterogeneity, Mast cell.

ÖZ

Bisphenol A'nın Rat Sindirim Kanalındaki Mast Hücrelerinin Dağılımı ve Heterojenitesi Üzerine Etkileri

Bisphenol A (BPA) dünya genelinde plastik ürünlerinde çok yaygın olarak kullanılan kimyasal bir bileşendir. Bu çalışmanın amacı insanların gündelik hayatlarında oldukça sık olarak maruz kaldığı BPA'nın mast hücrelerinin heterojenite ve dağılımı üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışma için 24 adet erkek Wistar Albino sıçan 4 gruba (Kontrol, Sham, 25mg/kg ve 50 mg/kg) ayrıldı. Bu grupların hepsine günlük standart diyet uygulanırken sham grubuna mısır yağı, diğer iki gruba ise (25mg/kg ve 50mg/kg) mısır yağı içerisinde çözündürülmüş olarak BPA 30 gün süre ile gavaj yoluyla verildi. İnhalasyon anestezi ile uyutulan deney hayvanlarından alınan sindirim kanalı doku örnekleri Basic Lead Acetate (BLA) ve Carnoy tespit solüsyonları kullanılarak tespit edildi. Ardından rutin doku takibi yapılarak paraplast ile bloklarıldılar. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler toluidine blue (TB) ve alcian blue-safranin O 8GX (AB/SO) kombine boyaları kullanılarak boyandı. TB ile boyanan kesitlerde mast hücrelerinin sayısı ve istatistiksel analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarına göre BLA tespit solüsyonunda Carnoy tespitine oranla daha fazla sayıda mast hücresi gözlemlenirken, BPA uygulanan gruplarda mast hücre sayılarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). AB-SO 8GX kombine boyama sonuçlarında ise sindirim kanalının incelenen neredeyse her kesitinde AB (+), S (+) ve mix (+) mast hücrelerine rastlandı. Ancak S (+) ve mix (+) Mast hücrelerinin sayıları genel olarak bakıldığında AB (+) mast hücrelerine oranla oldukça düşüktü. Yine bu boyama metodu neticesinde BPA uygulanan gruplar da dahil olmak üzere yapılan semi kantitatif değerlendirmelerde bir fark tespit edilemedi. Sonuç olarak BPA'nın mast hücrelerinin heterojenitesine bir etkisi istatistiksel olarak tespit edilemese de dağılımlarına etkisi olduğu gözlemlendi. Bundan dolayı daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bisphenol A, Gastrointestinal kanal, Heterojenite, Mast hücresi.



INTRODUCTION

Bisphenol A is an organic compound classified in the group of phenols. According to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), its name is 4,4-dihydroxy 2,2-diphenyl propane (Cas no: 80-05-7) (Mikolajewska et al. 2015). First synthesized in 1891, BPA monomers are obtained as a result of a condensation reaction with two parts phenol and one-part acetone (O'Brien 2013). BPA is a chemical that can be used in polycarbonate plastics for food and beverage containers and epoxy resins in the lining of metal cans (Bodin et al. 2014). Bisphenol A is available in a wide range of products, including food storage containers, water bottles, the inner lining of food and beverage cans, electronic devices, thermal papers, medical devices, and materials used in dental treatment to which many people are exposed (Özaydın et al. 2018). In addition to all these, it is also used in the manufacture of many products such as baby bottles and pacifiers, glasses, lenses, compact discs, window panels, including children's toys (Mikolajewska et al. 2015).

This chemical, which is produced in very high quantities, can pass into food and beverages from the containers where it is used under normal conditions. High temperatures (boiling, heating) greatly increase the rate of exposure and penetration (Braniste et al. 2010). BPA can enter the body through ingestion, inhalation, or dermal contact (Mikolajewska et al. 2015). However, since it can leak into food and beverage containers, the main exposure is through the digestive system (Sztmanska et al. 2018). Research shows that when BPA enters the body, it is rapidly absorbed in the gastrointestinal tract and metabolized in the liver and intestines (Mikolajewska et al. 2015). This happens with the glucuronidation activity of the body (Sakamoto et al. 2002). But newborns and babies with low glucuronidation activity are at real risk (Mikolajewska et al. 2015).

The main way of exposure is diet. However, the endocrine effects on the intestinal barrier function in direct contact with oral BPA have not yet been elucidated (Braniste et al. 2010). Similarly, what is known about its effects on mast cells is very limited. Although there have been studies on mediator release from mast cell granules (O'Brien et al. 2014a, 2014b), no information has been found on the effect of BPA on the heterogeneity and distribution of these cells.

Mast Cells

Mast cells are one of the important effector cells of the immune system. Recent studies show that they have immunomodulatory roles in both health and disease (Wernersson and Pejler 2014). Mast cells are present in almost all vascularized tissues in mammalian and non-mammalian vertebrates (Ribatti 2018). In general, mast cells are concentrated in places where antigens such as the skin, respiratory and digestive systems can enter the body (Ertugrul et al. 2017). This is because mast cells are one of the first cells that help the body take precautions against the ingress of foreign substances (Welle 1997).

These tissue cells, which contain pronounced cytoplasmic granules, have an important role in allergic reactions. They are taking place in pathophysiological conditions such as congenital and acquired immunity, wound healing, fibrosis, tumors, and autoimmune diseases (Puxeddu et al. 2003). These cytoplasmic granules may have been previously synthesized and stored, or they may have been synthesized after stimulation (Ertugrul et al. 2017). The immunological activity of mast cells is explained by the

release of these substances (Welle 1997). Together with these substances in the granules, mast cells are divided into two groups as connective tissue mast cell (CTMC) and mucosal mast cell (MMC) considering their location, origin, response to the detection solutions used, histochemical differences (Ertugrul et al. 2018). Unlike rodents, their classification in humans is made according to their protease content. According to this classification, there are mast cells containing only tryptase (mast cell tryptase - MCT) and mast cells containing chymase, cathepsin G, and carboxypeptidase (mast cell tryptase, Chymase - MCTC) together with tryptase. Humans have a third type of mast cell, which carry only chymase (mast cell chymase-MCC) (Ergün 2016).

Differences in mast cells also manifest themselves in their detection and staining properties. Connective tissue mast cells can be stained after fixating with 10% neutral buffered formalin, while mucosal mast cells can only be stained if they are fixated using non-aldehyde fixatives such as Carnoy (ethanol + chloroform + acetic acid) (Tikoo et al. 2018). In light of all this information, Carnoy and BLA (Basic lead acetate) are recommended in any microscopic study to fixate mast cells (Strobel et al. 1981). The most commonly used dyes to distinguish mast cells under a microscope are Toluidine Blue (TB) and Alcian Blue/safranin o (AB-SO) dye combinations. Without separating the mast cell type, toluidine blue staining shows metachromasia by staining the cell granules from purple to red, and mast cells are easily distinguished (Ribatti 2018). In the combined staining used to determine heterogeneity, both types of mast cells can be stained with Alcian Blue, while safranin o stain gives positive results only in connective tissue mast cells (Uslu and Yörük 2013).

The gastrointestinal tract houses the largest population of mast cells in the body. Mast cells respond to external and internal stimuli thanks to the variety of receptors they have on their surfaces. With the increased passage of lumen antigens into the mucosa, the intestinal barrier is disrupted, which further facilitates mucosal mast cell activation, inflammatory responses, and mast cell-enteric nerve interaction (Albert-Bayo et al. 2019).

In this sense, it is not known how BPA affects the heterogeneity and distribution of mast cells after absorption in the intestines, where it is most commonly taken up in the body. This study aims to try to explain this issue.

MATERIAL AND METHODS

This study has been approved by the Local Ethics Committee of Van Yuzuncu Yil University (decision date: 07.03.2019 and numbered: 2019/2).

Experimental Design and Application of BPA

24 male Wistar Albino rats (these rats reached adult age in the same period) with an average weight of 200-250 g. were supplied as experimental animals from Van YYU Experimental Application and Research Center. These rats were divided into four different groups. Two of these four groups received BPA at doses of 25 mg/kg/day and 50 mg/kg/day (Schwetz and Harris 1993, Tolba and Mandour 2018). This BPA application was done by oral gavage by dissolving in corn oil (Menard et al. 2014; Aydemir et al. 2018; Özaydın et al. 2018; Tolba and Mandour 2018). No extra was applied to the control group. In the Sham group, corn oil oral gavage was applied for positive control. During the thirty-day exposure study (Tolba and Mandour 2018), their daily diet (pellet feed-ad libitum nutrition)

was continued as normal in all experimental groups (Aydemir et al. 2018).

The exposure study was terminated by using an isoflurane inhalation anesthetic in experimental animals (Veilleux-Lemieux et al. 2013). Tissue samples were then taken.

Microscopic Examination

Tissue samples taken from the organs forming the digestive tract (esophagus, ventriculus, duodenum, ileum, jejunum, cecum, colon) were fixed by immersion method using Carnoy (Strobel et al. 1981) and BLA (Basic Lead Acetate) (Becker et al. 1985) solutions. The tissues were then processed using routine histological technique and blocked with paraplast (Enerbeck 1966a). The sections prepared from these blocks were stained with 0.5% Toluidine Blue (TB) (Enerbeck 1966b) for identification and counting of mast cells and Alcian Blue-Safranin O 8GX (AB-SO 8 GX) combined dyes to determine their heterogeneity (Tung 1991; Bancroft and Cook 1994).

In the sections prepared with Toluidine Blue, cell counts were performed on 24 randomly determined areas (since there was no previous study on the subject in the literature, the histological layers were ignored and the evaluation was made) without taking into account their histological layers. These counts were made using 100 square ocular micrometers (eyepiece graticule) at a lens magnification of 40. Arithmetic averages of the data obtained as a result of the enumeration of mast cells were taken. These data were then converted to the number of mast cells in a unit area of 1 mm² (Mulisch and Welsch 2015) (Romeiss mic. teq.).

Statistical Analysis

Descriptive statistics for continuous variables; expressed as average, standard deviation, minimum, and maximum values. In terms of the relevant feature; a 3-factor Factorial Analysis of Variance was performed to determine whether there was a difference between the levels of organ and group factors. Following the analysis of variance; In identifying different groups and organs Duncan's multiple comparison test was used. Since the interactions were found to be statistically important multiple comparisons were made at the level of subgroups. The statistical significance level was taken as 5% in the calculations and SPSS (ver: 20) statistical package program was used for the calculations.

RESULTS

Microscopic Findings

The first finding was that the Carnoy and BLA fixative solutions protected mast cells and granules quite well. Among these two fixative solutions, it was observed that the BLA fixative solution was more suitable than the Carnoy fixative solution (Figures 1A (BLA), 1B (Carnoy)). In histological staining, Toluidine Blue showed metachromasia in all organ sections taken and showed mast cells purple-violet color. In Alcian Blue-Safranin O staining, Alcian Blue positive (AB+), safranin positive (S+), and mix positive (Mix+) mast cells were easily distinguished, and the granules in the cells were mostly observed in homogenous appearance. (Figures 2A, 2B, 2C, 2D). In all organ sections, mast cells were mostly observed in the lamina propria and submucosa layers, while mast cell numbers were more or less sparse in the other layers. In Toluidine Blue staining the shapes of the mast cells and granules were fully consistent with the general information about these cells. In the regions where the number of mast cells in the BPA groups increases, there is also a decreased appearance of granules (Figure 3B).

Statistical Analysis Results

When the statistical analysis results of mast cell count in toluidine blue staining were examined, more mast cells were detected in tissue samples detected with BLA fixation solution than Carnoy. When the number of mast cells was examined regardless of the fixative and experimental group, the highest number of mast cells was found in the cecum and the least in the ventriculus section. It is thought that this may be because there is more absorption in the intestinal parts than in the ventriculus. When the experimental groups are examined, the increase in the number of mast cells is noticeable in the groups where BPA is applied in doses of both 25 mg/kg/day and 50 mg/kg/day. When this increase is evaluated based on organs, it is seen that the number of mast cells in the jejunum, cecum, and colon sections increases (Table 1) (<0.05). According to the semiquantitative evaluations in tissue samples stained with AB-SO 8 GX Combined dye, no significant difference was found between the S+, AB+, or Mix+ features of mast cells. Again, it was seen that this situation was similar when evaluated separately within the experimental groups and fixatives (Table 2). Accordingly, no significant heterogeneity could be detected.

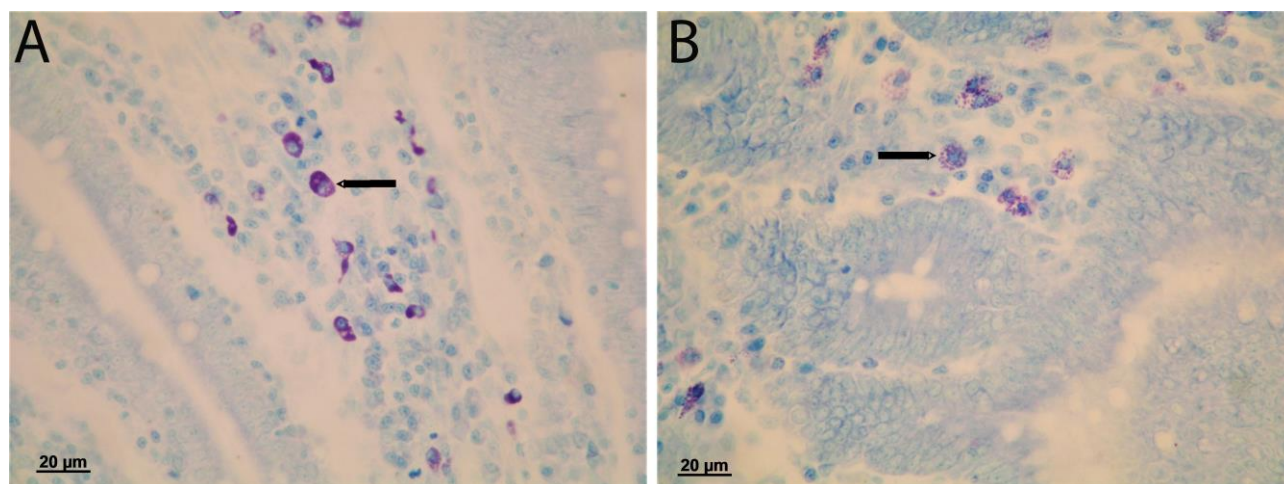


Figure 1. TB staining of mast cells in BLA (A) and Carnoy (B) solutions.

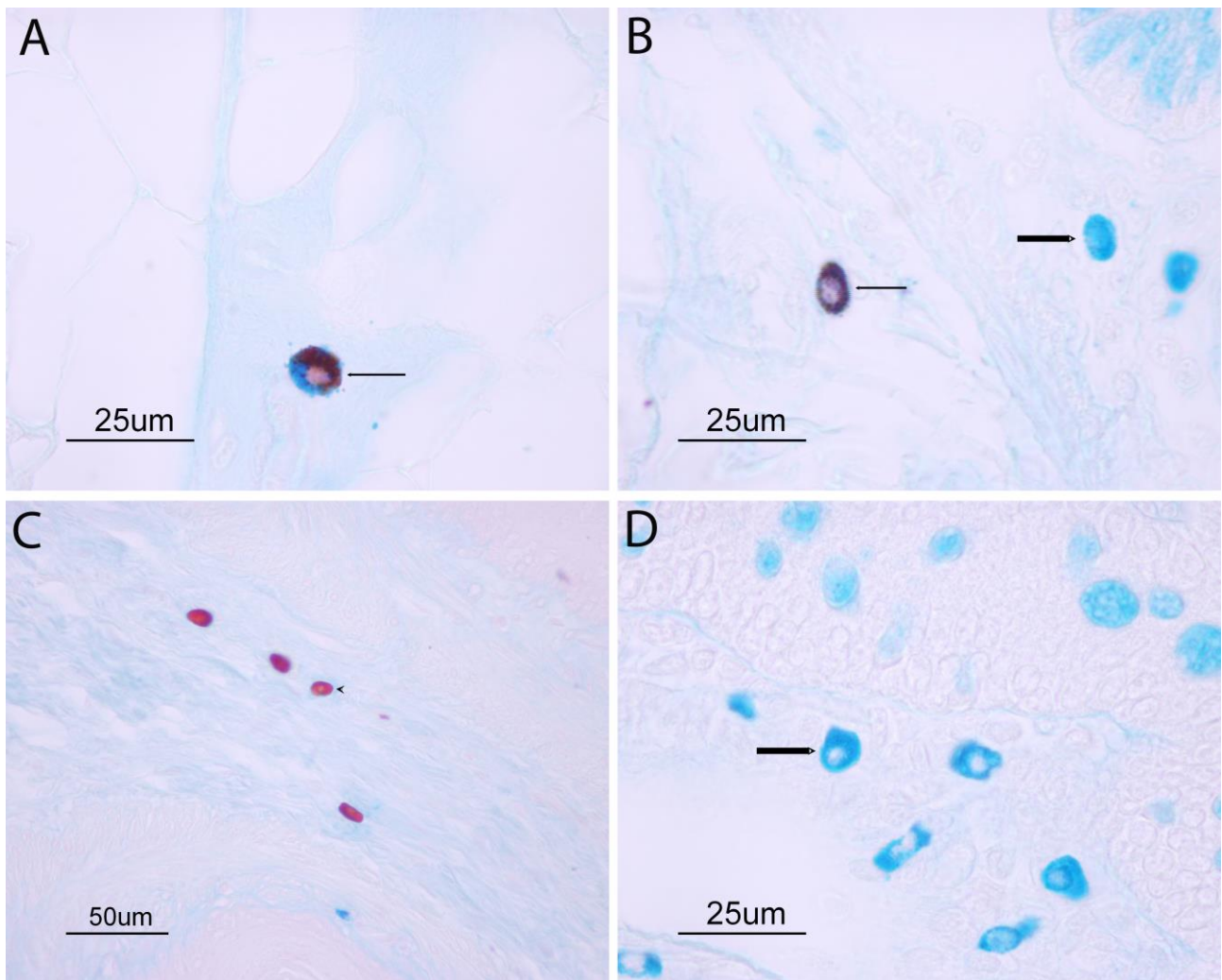


Figure 2. Mast cells in AB-SO staining. Mix+ (A-B), S+ (C), AB+ (B-D).

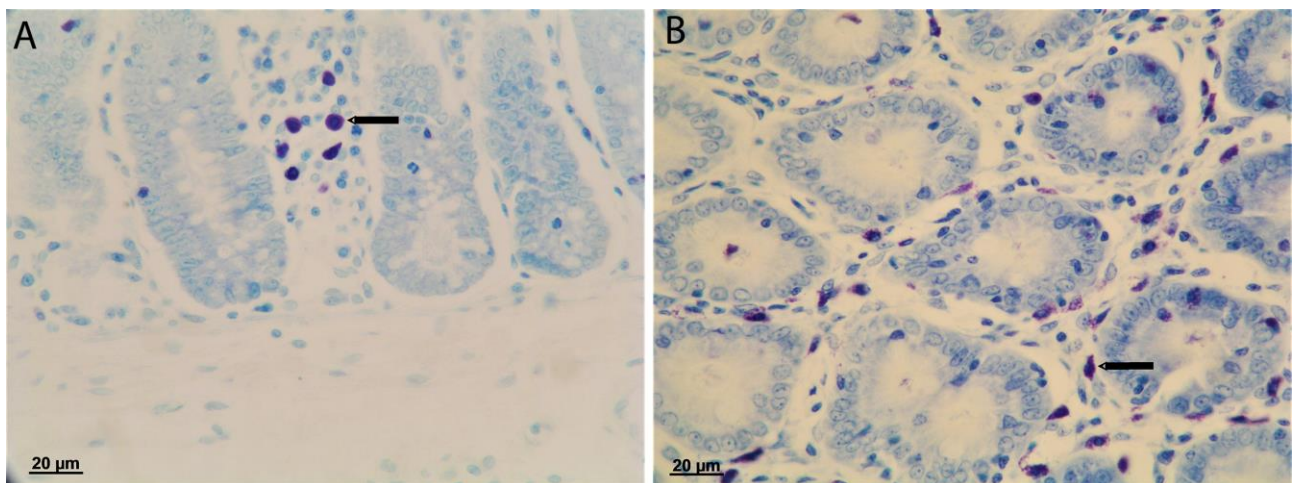


Figure 3. Mast cells in TB staining. The appearance of mast cells in Sham (A) and 50 mg/kg/day (B) groups in the cecum.

Table 1. Descriptive statistics and comparison results of mast cells.

| Fixative | Organ | GROUP | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------------|-----------|-----------|-------|--------|------------|-----------|--------|--------|---------------|-----------|--------|--------|---------------|-----------|--------|--------|
| | | 1-Control | | | | 2-Sham | | | | 3-BPA-25mg/kg | | | | 4-BPA-50mg/kg | | | |
| | | Av. | Std. dev. | Min. | Max. | Av. | Std. Dev. | Min. | Max. | Av. | Std. Dev. | Min. | Max. | Av. | Std. Dev. | Min. | Max. |
| 1-Carnoy | Esophagus | b 50.72 | 14.35 | 33.28 | 70.56 | Cd# 38.72 | 6.26 | 32.64 | 49.28 | a 55.72 | 21.08 | 35.92 | 84.00 | c 44.27 | 9.59 | 35.20 | 57.92 |
| | Ventriculus | c 30.37 | 11.25 | 19.20 | 52.00 | d 30.05 | 9.71 | 17.92 | 44.64 | b 37.60 | 9.08 | 29.28 | 53.28 | c 35.52 | 11.28 | 21.92 | 49.92 |
| | Duodenum | ab 66.93 | 18.46 | 44.64 | 95.20 | a 77.71 | 13.38 | 61.28 | 92.64 | a# 74.51 | 18.22 | 60.00 | 108.64 | b 66.83 | 15.40 | 45.92 | 92.00 |
| | Ileum | b# 56.83 | 9.58 | 48.64 | 73.92 | ab# 58.51 | 22.77 | 41.28 | 96.64 | a# 61.81 | 14.92 | 36.64 | 75.20 | b 74.69 | 10.96 | 59.20 | 89.28 |
| | Jejunum | Bab 62.0 | 19.60 | 48.64 | 101.92 | B# 50.13 | 14.40 | 36.64 | 71.20 | B# 67.95 | 15.91 | 49.28 | 90.56 | Aa# 93.28 | 12.58 | 78.56 | 109.28 |
| | Cecum | Ba# 78.40 | 15.25 | 64.00 | 105.28 | Bab# 69.60 | 24.55 | 40.64 | 97.92 | Ba# 64.27 | 15.11 | 51.20 | 90.56 | Aa# 100.79 | 16.32 | 71.20 | 115.20 |
| | Colon | Bc# 15.49 | 2.53 | 12.64 | 18.56 | Ba# 19.25 | 12.41 | 5.28 | 41.28 | Ab# 32.48 | 9.60 | 23.20 | 48.64 | Ac# 38.03 | 13.35 | 18.56 | 57.28 |
| 2-BLA | Esophagus | Bd 38.13 | 5.75 | 30.56 | 47.20 | ABc 47.04 | 3.80 | 41.92 | 53.28 | Ad 53.95 | 10.97 | 43.20 | 69.28 | ABd 43.07 | 11.75 | 28.00 | 57.92 |
| | Ventriculus | d 33.04 | 4.97 | 25.28 | 37.92 | c 43.15 | 17.49 | 25.92 | 69.92 | d 42.03 | 9.79 | 34.56 | 60.00 | d 34.72 | 12.55 | 25.92 | 59.20 |
| | Duodenum | bc 94.37 | 28.66 | 55.20 | 126.56 | b 85.49 | 31.57 | 28.64 | 121.92 | b 106.16 | 20.97 | 84.64 | 135.20 | c 83.07 | 17.77 | 68.64 | 105.92 |
| | Ileum | b 106.08 | 15.33 | 80.00 | 121.28 | b 90.03 | 19.42 | 73.92 | 127.20 | b 105.47 | 14.53 | 81.92 | 127.20 | bc 95.63 | 21.49 | 76.00 | 121.92 |
| | Jejunum | Bc 81.39 | 19.58 | 67.20 | 118.40 | B 82.85 | 5.02 | 77.28 | 92.00 | Ab 116.93 | 11.66 | 100.00 | 131.20 | Ab 110.37 | 12.57 | 96.64 | 128.64 |
| | Cecum | Ba 134.03 | 26.42 | 84.64 | 163.20 | Ba 138.75 | 12.57 | 121.28 | 151.20 | Aa 185.31 | 37.43 | 153.92 | 249.92 | Aa 173.25 | 16.86 | 150.56 | 194.56 |
| | Colon | Bc 60.37 | 13.73 | 39.20 | 76.00 | B 58.05 | 20.86 | 29.28 | 92.00 | A 79.25 | 14.06 | 60.64 | 97.92 | Abc 95.15 | 11.24 | 80.00 | 113.92 |

A. B. C → The difference between groups that receive different capital letters within the same fixative and organ (on the same line) is statistically significant (p<0.05) (Comparison of groups.).

a. b. c ↓ The difference between the organs receiving different lowercase letters within the same group and fixative (in the same column) is statistically significant (p<0.05) (Comparison of organs.).

#: The difference from the second fixative is significant (p<0.05).

Table 2. Results of semi-quantitative evaluation of AB-SO staining of mast cells.

| | | CONTROL | | SHAM | | BPA-25mg/kg | | BPA-50mg/kg | |
|-------------|-----|---------|-----|--------|-----|-------------|-----|-------------|-----|
| | | Carnoy | BLA | Carnoy | BLA | Carnoy | BLA | Carnoy | BLA |
| Esophagus | AB | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + |
| | SO | ++ | ++ | ++ | + | + | +++ | + | +++ |
| | Mix | ++ | +++ | + | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Ventriculus | AB | +++ | + | +++ | ++ | +++ | + | +++ | ++ |
| | SO | ++ | + | + | + | + | + | + | + |
| | Mix | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| Duodenum | AB | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SO | - | - | ± | - | ± | - | - | ± |
| | Mix | ± | ± | - | ± | ± | ± | ± | ± |
| Ileum | AB | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SO | - | ± | - | - | - | - | - | - |
| | Mix | - | ± | ± | - | ± | - | - | - |
| Jejunum | AB | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SO | - | ± | ± | - | ± | - | ± | - |
| | Mix | - | ± | - | - | ± | - | ± | - |
| Cecum | AB | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SO | ± | ± | + | - | ± | ± | ± | + |
| | Mix | + | + | ++ | + | ++ | ++ | + | ++ |
| Colon | AB | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SO | - | - | - | ± | ± | ± | ± | - |
| | Mix | - | ± | ± | ± | ± | + | ± | ± |

(-) Not available (±) Very rare (+) Rare (++) Few (+++) Too many.

DISCUSSION AND CONCLUSION

This study, it was aimed to investigate the effects of BPA taken by digestion on the heterogeneity and distribution of mast cells in the organs that make up the gastrointestinal tract. There is only a limited amount of literature on the effects of BPA on immune system cells and especially on mast cells (O'Brien et al. 2014a, 2014b).

Results in direct proportion to the literature information were obtained from the fixative solutions used in the study. In the literature, it is emphasized that better results are obtained with BLA and IFAA detections in the respiratory tract of geese and ducks (Uslu and Yörük 2013). Similarly, in a study conducted on dog skin, a greater number of mast cells were fixated in the fixative of BLA (Becker et al. 1985). In a study conducted in the digestive tract of turkeys, it is stated that basophilic granules are observed more clearly in the tissues fixated by BLA (Uslu and Yörük 2008). The research findings are in parallel with all these studies in both types of mast cells.

The most preferred dye for the demonstration of mast cells in histological preparations is TB staining, which shows metachromasia. But for the determination of heterogeneity, AB-SO combination dye is preferred. Metachromasia was easily distinguished in this study, as in TB staining of geese and duck (Uslu and Yörük 2013), turkey (Uslu and Yörük 2008), quail and chicken (Kurtdele and Yörük 1995), cattle, sheep and goat (Ertuğrul and Kurtdele 2017). As a result of AB-SO staining, AB+, S+, and mix+ mast cells were detected along the rat digestive tract. Tung Wang (1991) has observed that as a result of AB-SO 8GX staining in the small intestines of chickens, mast cells in the villi contain only blue-colored dyed granules, while those in the submucosa contain both blue and red granules. In their study of the digestive tract, Yörük and Uslu (2008) report that connective tissue mast cells are stained red and mucosal mast cells are painted blue, and S+ stained mast cells are very rare. Again, in the study conducted by Yörük and Karaca (2004), similar results were obtained in terms of the AB-SO staining properties of mast cells and the regions where they are located. The findings obtained as a result of AB-SO staining in all these studies are directly proportional to this study.

In this study of rats' digestive tract, mast cells were seen in the esophagus, stomach, and colon parts of the digestive tract, mostly in the submucosa layer. In other parts of the digestive tract, the density is in the areas where the villi and crypts are. Statistically, mast cells were detected at least in the stomach (avg: 35,81) and at most in the cecum (avg: 118, 04) parts. In the groups that received BPA, the number of mast cells increased considerably compared to the non-applied groups. It is possible to see that this increase is especially in the jejunum, cecum, and colon parts (Table 1).

In the studies of Strobel (1981) in human jejunum, Ertuğrul (2017) in the urinary systems of cattle, sheep, and goats, and Uslu (2013) in the goose respiratory tract, the density of mast cells detected in lamina propria in the regions where villus and crypts are located is seen as in this research. The increase in the number of mast cells was similarly detected in a study conducted on the canine intestinal mucosa (Eren et al. 2000). Likewise, Sokol (2013) says that mast cell counts are always higher in inflammatory bowel disease (IBD) situations. Mast cells increase in inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis, as in IBD, but also in diseases

such as celiac, and irritable bowel syndrome (Frossi et al. 2018).

In a study on the activation of mast cells (Akin 2017), two conditions are identified in which this activation can cause pathological clinical symptoms. The first are situations in which mast cells are produced qualitatively and quantitatively abnormally, and the second is when mast cell activation is disproportionate to the need to protect the body from perceived danger. This can occur when there is an imminent threat from infections, physical triggers, poisons, or allergens. An extreme example of abnormal mast cell activation is anaphylaxis. In this study, as a result of BPA application, it was observed that there was an increase in the number of mast cells in the digestive tract, especially in the cecum section, and that there was a decrease in cell granules, especially in the villi areas of the digestive tract. In light of this information, it is thought that BPA activates mast cells quite a lot. The increase and abnormal activation of mast cell counts in the digestive tract may also affect released mediators, visceral sensitivity, and intestinal barrier function, as noted in another study (Ramsay et al. 2010).

BPA, a monomer of polycarbonate plastics and epoxide resins, has been shown to function as an endocrine active compound and increase the inflammatory response (O'Brien et al. 2014a). According to the statistical analysis results obtained in this study, the increase in the number of mast cells in the experimental groups where BPA was applied and the decreased appearance in the granules of mast cells that stood out at the microscopic level also support this information.

In the literature, O'Brien et al. have two studies investigating the release of BPA from mast cell lines through mediators (2014a, 2014b). In the first of these studies, the relationship between BPA exposure in the perinatal period and asthma pathogenesis in the adult period was examined. To determine this relationship, asthma-related inflammatory mediators were evaluated through mediators of bone marrow-derived mast cells (BMMC). In this study, it was determined that the release of cysteinyl leukotrienes (CysLT), PGD₂, TNF- α , and IL-13 from BMMCs increased in adulthood as a result of perinatal BPA exposure, and a link was established between perinatal BPA exposure and irregularity of mast cells in adulthood (O'Brien et al. 2014b). The second study investigated whether short-term BPA exposure in mice (amounts thought to be exposed to humans) would increase the release of histamine and CysLTs from BMMCs. In this study, acute BPA exposure increased the release of histamine and CysLTs from mast cells in vitro. (O'Brien et al. 2014a) The findings obtained from these two studies that BPA can stimulate mast cells and increase mediator release coincide with the findings of our study. (Figures 3A,3B)

As can be seen from the results of statistical analysis (Table 1), the increase in mast cell numbers occurring in the digestive tract of experimental animals where BPA was administered through oral gavage was detected in the jejunum, cecum, and colon. In their study, Sakamoto et al. (2002) showed that orally administered BPA by dissolving in olive oil was glucuronized, by UDP-glucuronyltransferase UGT2B1 in the liver in rats, and excreted into the bile. They found that most of the Bisphenol A glucuronide (BPA-GA), which passes through bile into the small intestine, is deconjugated in the cecum. After BPA administration (after 15 min), they detected BPA-GA in the small intestine, but free BPA in the contents

of the cecum and colon. They have stated that BPA is reabsorbed in the colon because the free BPA detected in the colon is less than in the cecum. This information suggests that the increase in the number of mast cells detected in the cecum and colon may be related to the digestive parts where free BPA is present.

BPA is a chemical that is widely used around the world and can have negative effects on the lives of almost all living things. It was concluded that further studies were needed to increase knowledge about the effects of this chemical on immune system cells, disease, tissue, and organ. In this study, the heterogeneity and distribution of mast cells in BPA-treated experimental animals were tried to be revealed. Since there is not enough literature information in terms of the effects of BPA on immune system cells, especially mast cells, it is thought that this study will contribute to the literature on this subject.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by Van Yuzuncu Yil University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project ID: TDK-2019-8358).

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

This study has been approved by the Local Ethics Committee of Van Yuzuncu Yil University (decision date: 07.03.2019 and numbered: 2019/2).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: HCY, MY

Supervision / Consultancy: HCY, MY

Data Collection and / or Processing: HCY, MY

Analysis and / or Interpretation: HCY, MY

Writing the Article: HCY, MY

Critical Review: HCY, MY

REFERENCES

- Akin C (2017). Mast cell activation syndromes. *J Allergy Clin Immunol*, 140 (2), 349-355.
- Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM et al. (2019). Intestinal mucosal mast cells: key modulators of barrier function and homeostasis. *Cells*, 8 (2), 135.
- Aydemir I, Kum Ş & Tuğlu M İ (2018). Histological investigations on the thymus of male rats prenatally exposed to bisphenol A. *Chemosphere*, 206, 1-8.
- Bancroft JD and Cook HC (1994) Manual of histological techniques and their diagnostic application. 2. th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, New York.
- Becker AB, Chung KF, McDonald DM, et al. (1985). Mast cell heterogeneity in dog skin. *Anat Rec*, 213 (4), 477-480.
- Bodin J, Bølling AK, Becher R, et al. (2014). Transmaternal bisphenol-a exposure accelerates diabetes type 1 development in nod mice. *Toxicol Sci*, 137 (2), 311-323.
- Braniste V, Jouault A, Gaultier E, et al. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *PNAS*, 107 (1), 448-453.
- Enerback L (1966a) Mast cell in rat gastrointestinal mucosa 1. Effects of Fixations. *Acta Path et Microbiol Scandinav*, 66 (3), 289-302.
- Enerback L (1966b) Mast cell in rat gastrointestinal mucosa 2. Dye-Binding and metachromatic properties. *Acta Path et Microbiol Scandinav*, 66 (3), 303-312.
- Eren Ü, Güzel N, Türkütanıt S, Durukan A, Ergüdürenler Ş, Kara ME (2000). Köpeklerde barsak mukozasında mast hücreleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47, 125-134.

- Ergün L (2016) Connective Tissue. Özer A, editör. Temel Histoloji. (3rd ed). Ankara: Dora Publishing.
- Ertuğrul T, Çiftci G, Tütüncü Ş (2017). Formaldehit maruz kalmış ratlarda böbrek dokusunda mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi. *Vet Hek Der Derg*, 88 (2), 26-37.
- Ertuğrul T and Kurtkede N (2017). Sığır Koyun ve Keçilerin Üriner Sistem Mast Hücreleri Üzerinde Histolojik Çalışmalar. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 57 (1), 32-38.
- Ertuğrul T, Tutuncu S, Kabak M, Onuk B (2018). The distribution and heterogeneity of mast cells in tongue from five different avian species. *Anat Histol Embryol*, 47 (4), 306-312.
- Frossi B, Mion F, Sibillano R, Danelli L, Pucillo CEM (2018). Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*, 282 (1), 35-46.
- Karaca T and Yörük M (2004). A Morphological and histometrical study on distribution and heterogeneity of mast cells of chicken's and quail's digestive tract. *Van Vet J*, 15 (1-2), 115-121.
- Kurtkede N, Yörük M. (1995) Tavuk ve bıldırcın derisinde mast hücrelerinin morfolojik ve histometrik incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42, 77-83.
- Menard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, et al. (2014) Perinatal exposure to a low dose of bisphenol a impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *Plos One*, 9 (11), 1-15.
- Mikołajewska K, Stragierowicz J, Gromadzińska J (2015). Bisphenol A - Application, sources of exposure, and potential risks in infants, children, and pregnant women. *Int J Occup Med Environ Health*, 28, 209-241.
- Mulisch M and Welsch U (2015). Romeis mikroskopische technik. (19.ed.) Berlin, springer spektrum.
- O'Brien E (2013). The effect of bisphenol-a exposure on mast cell function and pulmonary inflammation associated with asthma (Ph.D. thesis). University of Michigan, Michigan.
- O'Brien E, Dolinoy DC, Mancuso P (2014a). Bisphenol A at concentrations relevant to human exposure enhances histamine and cysteinyl leukotriene release from bone marrow-derived mast cells. *J Immunotoxicol*, 11 (1), 84-89.
- O'Brien E, Dolinoy DC, Mancuso P (2014b). Perinatal bisphenol A exposures increase the production of pro-inflammatory mediators in bone marrow-derived mast cells of adult mice. *J Immunotoxicol*, 11 (3), 205-212.
- Özaydn T, Öznurlu Y, Sur E, Çelik İ, Uluşık D (2018). The effects of bisphenol A on some plasma cytokine levels and distribution of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in the spleen, ileal Peyer's patch, and bronchus-associated lymphoid tissue in rats. *Acta Histochemica*, 120 (8), 728-733.
- Puxeddu I, Pilipovsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F (2003). Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol*, 35 (12), 1601-1607.
- Ramsay DB, Stephen S, Borum M, Voltaggio L, Doman DB (2010). Mast cells in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol*, 6 (12), 772-777.
- Ribatti D (2018). The staining of mast cells: a historical overview. *Int Arch Allergy Immunol*, 176 (1), 55-60.
- Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A (2002). Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1573 (2), 171-176.
- Sokol H, Georgin-Lavialle S, Canioni D, et al. (2013). Gastrointestinal manifestations in mastocytosis: A study of 83 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 132 (4), 866-873.
- Strobel S, Miller HR, Ferguson A (1981). Human intestinal mucosal mast cells: Evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol*, 34 (8), 851-858.
- Schwetz BA and Harris MW (1993). Developmental toxicology: status of the field and contribution of the national toxicology program. *Environ Health Perspect*, 100, 269-282.
- Szymanska K, Makowska K, Gonkowski S (2018). The influence of high and low doses of bisphenol a (BPA) on the enteric nervous system of the porcine ileum. *Int J Mol Sci*, 19 (3), 917.
- Tikoo S, Barki N, Jain R, et al. (2018). Imaging of mast cells. *Int Rev Immunol*, 282 (1), 58-72.
- Tolba AM and Mandour DA (2018). Histological effects of bisphenol-A on the reproductive organs of the adult male albino rat. *Eur J Anat*, 22 (2), 89-102.
- Tung W (1991). Mast cells in the chick digestive tract. II. Fixation, distribution, histochemistry, and ultrastructure. *Tokai J Exp Clin Med*, 16, 27-32.
- Uslu S and Yörük M (2008). Hindilerde sindirim sisteminde mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar. *Van Vet J*, 19 (2), 47-51.

Uslu S and Yörük M (2013). Morphological and histometric studies on mast cell distribution and heterogeneity, present in the lower respiratory tract and the lung of local duck (*anas platyrhynchus*) and goose (*anser anser*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 19, 475-482.

Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, Vachon P (2013). Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old sprague-dawley rats. *J Am Assoc.* 52 (5), 567-570.

Welle M (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol.* 61 (3), 233-245.

Wernersson S and Pejler G (2014). Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 14 (7), 478-494.



Fermantasyon ve Kurutma Boyunca Tarhana Hamurunda Meydana Gelen Organik Asit Kinetiğinin Belirlenmesi

Ali SOYUÇOK*^{ID}

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Food Agriculture and Livestock Vocational School, Department of Food Processing, 15030, Burdur, Turkey

Received: 30.09.2022

Accepted: 06.11.2022

ÖZ

Bu çalışmanın amacı fermantasyon ve kurutma boyunca tarhana hamurunda meydana gelen organik asit profilinin belirlemektir. Tarhana fermantasyonun 0., 3., 5., 7., 9., 11., 13 ve 15. günlerde ve kurutmanın meydana geldiği 16., 17., 19. ve 21. günlerde örnekler alınarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) okzalik asit, tartarik asit, formik asit, malonik asit, laktik asit, asetik asit, sitrik asit, süksinik asit ve propiyonik asit içerikleri araştırılmıştır. Çalışmamızdaki tarhana hamurunda okzalik asit, formik asit ve malonik asit belirlenmemiştir. Hem fermantasyon hem kurutma işlemi sırasında en yüksek düzeyde bulunan organik asitlerin laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit olduğu görülmüştür. Ayrıca Pearson Korelasyon testi sonuçlarına göre süksinik asidin diğer organik asitler ile tartarik asit ve propiyonik asit arasında bir korelasyon gözlemlenmemiştir. En yüksek korelasyon laktik asit ve asetik asit arasında bulunmuştur ($r=0.911$, $p<0.01$). Çalışmamızda tarhana hamurunun kurutulması sırasındaki organik asitlerinin belirlenmesi, tarhana çorbası yapımında üründe bulunabilecek organik asitler hakkında fikir vermesini sağlayarak tarhana çorbasının fonksiyonel bir gıda olmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asit, Fermantasyon, Kromatografi, Kurutma, Tarhana, Yüksek basınçlı sıvı.

ABSTRACT

Determination of Organic Acid Kinetics in Tarhana Dough During Fermentation and Drying

The aim of this study is to determine the organic acid profile of tarhana dough during fermentation and drying. The content of oxalic acid, tartaric acid, formic acid, malonic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid and propionic acid in tarhana samples were taken on the 0th, 3rd, 5th, 7th, 9th, 11th, 13th, and 15th days of fermentation and on the 16th, 17th, 19th, and 21st days of drying in tarhana and samples were analyzed via high-pressure liquid chromatography (HPLC). It was determined that the organic acids found at the highest levels during both fermentation and drying processes were lactic acid, acetic acid and propionic acid. In addition, according to the Pearson Correlation test, no correlation was observed between succinic acid with other organic acids and between tartaric acid and propionic acid. The highest correlation was found between lactic acid and acetic ($r=0.911$, $p<0.01$). It is thought that our study will contribute to tarhana soup being a functional food by providing an idea about the organic acids that can be found in the product while making tarhana soup.

Keywords: Acid, Chromatography, Drying, Fermentation, High pressure liquid, Tarhana.

GİRİŞ

Tarhana, buğday unu, yoğurt, kırmızı biber, domates, soğan, tuz ve nane karışımının fermantasyonu sonucu elde edilen fermente bir gıdadır (Özdemir ve ark. 2018). Türkiye’de yaygın olarak üretilen ve tüketilen bu fermente ürün; fermantasyon süresi, kurutma süresi, ingredientlerin çeşidi ve miktarı gibi nedenlerden dolayı bölgesel farklılıklar göstermektedir (Kömürçü ve Bilgiçli 2022). Yoğurt, kaymak ve tahıl unları gibi yapısında laktik asit bakterilerini ve mayaları içeren bu gıdalar fermantasyon için gerekli mikroorganizmalar bakımından önemli

kaynaklardır. Bu mikroorganizmaların lipolitik, proteolitik ve amilolitik aktiviteleri sonucunda ürünün aroması ve tadı oluşmaktadır (de Vuyst ve Leroy 2007). Laktik asit bakterileri fermantasyon boyunca asit oluşumundan sorumlu tutulurken mayalar ise aroma ve tadın oluşmasından sorumlu tutulmaktadır (Tamang ve ark. 2020). Fermantasyon sıcaklığı genellikle 30-35°C arasında süresi ise üretildiği bölgelere göre farklılık göstermekte olup 5 ile 21 gün arasında değişmektedir (Tangüler 2014; Soyucok ve ark. 2021).

Hamur fermantasyonu sayesinde tarhana B grubu



vitaminler, mineral maddeler ve amino asit miktarı bakımından zengin bir kaynak olmaktadır (Göncü 2020). Ayrıca kompleks protein yapıların fermentasyon sırasında hidrolize edilmesiyse bu yapıların sindirilebilirliği de artmaktadır (Karahan ve ark. 2019).

Laktik asit bakterileri tarafından organik asit üretimi ve kurutma sırasında fazla nem miktarının uzaklaşması patojen mikroorganizmalara karşı bakteriyostatik bir etki sağlayacağından ürünün raf ömrünü arttırmaktadır (Tuluk ve Ertaş 2019). Fermentasyon sırasında oluşan organik asitler; son ürünün duyu özelliklerinin, stabilitesinin ve kalite parametrelerinin korunmasında katkı sağlamaktadırlar (Yazıcı 2016). Tarhananın tat ve aroma maddeleri laktik asit fermentasyonu sırasında oluşan laktik asit, etil alkol ve karbondioksitten kaynaklanmaktadır. Laktik asit fermentasyonu sayesinde tarhananın laktoz intoleransına sahip kişiler tarafından tüketilebilir hale gelebildiği bilinmektedir (Karahan ve ark. 2019). Homofermentatif laktik asit bakterileri sadece laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik aside ek olarak asetik asit ve formik asit üretmektedir. Özdemir ve ark. (2018), tarhana hamurundaki organik asitlerin laktik, süksinik ve asetik asitler olduğunu ifade etmişlerdir. Tarhana fermentasyonu boyunca oluşan asetik asit küf gelişimini önlemekte ve tarhana aromasının oluşmasına katkı sağlamaktadır (Magala ve ark. 2013).

Tarhananın beslenmedeki önemi dikkate alındığında Türk mutfağında önemli bir yeri vardır. Bu nedenle çeşitli araştırmacılar tarafından tarhana üretimi, ham maddeleri, fermentasyon süresi ve başlatıcı kültür kullanım imkanları araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, çölyak hastaları için glutensiz tarhana üretiminde buğday unu yerine lupin, nohut, kuru fasulye ve karabuğday unlarının kullanım imkanının olduğu ifade edilmiştir (Tuluk ve Ertaş 2019). Atar ve Özsisli (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; araştırmacılar haşhaş tohumunun Beyşehir tarhanasında kullanım imkanını ortaya koymuşlardır. Gohari (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, kiona ve nohut unu ilave edilmiş tarhanın köpürme, su tutma ve emülsiyon kapasitelerinin arttığı ifade edilmiştir. Özdemir ve ark. (2018) tarhana aromasının oluşmasında *Lactobacillus alimentarius* ve *Pichia kudriavzevii*'nin etkili olduğu ve esterleşme, alkol oluşumu ile birlikte organik asitlerin varlığının da aroma üzerinde rol oynadığını ifade etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, tarhana üretiminde yoğurt yerine kefir kullanımının fermentasyon aktivitesini arttırdığı ve yoğurdun yerine iyi bir alternatif olduğu ifade edilmiştir (Demirci ve ark. 2018).

Bu çalışmada tarhana hamurundan fermentasyon, ön kurutma ve son kurutma boyunca örneklem yapılarak organik asit değişimi araştırılmış ve organik asitler arasındaki ilişki istatistiksel ortaya konmuştur.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Tarhana yapımında Soyuçok ve ark. (2021) tarafından önerilen miktarlarda buğday unu, nohut unu, soğan, kapy biber, domates ve tuz materyal olarak kullanılmıştır. Ham maddeler yerel satıcılardan 2022 yılının ağustos ayında temin edilmiştir.

Tarhana Yapımı

Soğanın kabuğu soyulduktan sonra yıkanmış ve doğranmış kapy biber ve domates ile birlikte yaklaşık 90 dakika kaynatılmıştır. Soğuyan sebze karışımı bir blender (Arzum, Türkiye) yardımıyla pulp haline getirildikten sonra buğday

unu, nohut unu, yoğurt ve tuz ilave edilerek homojen hale gelinceye kadar yoğurulmuştur. 30-32°C sıcaklıkta 15 gün fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyonun sonunda (16. günde) küçük parçalar halinde ön kurutmaya bırakıldıktan sonra 17. günde toz haline getirilerek 21. günde tarhana üretimi tamamlanmıştır.

Organik Asit Analizi

-Kullanılan organik asitler ve standartların hazırlanması;

Bu çalışmada kullanılan okzalik asit, tartarik asit, formik asit, malonik asit, laktik asit, asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, propiyonik asit standartları Sigma-Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) markasından temin edilmiştir.

Okzalik asit; 100 mg/L, tartarik asit; 1000mg/L, formik asit; 1000 mg/L, malonik asit; 1000 mg/L, laktik asit; 1000 mg/L, asetik asit;1000 mg/L, sitrik asit; 100 mg/L, süksinik asit; 1000 mg/L ve propiyonik asit; 100 mg/L konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlanmıştır.

-Örnek hazırlama;

Tarhana örneklerinden organik asit ekstraksiyonu su ile yapılmıştır. Tüpe 5 g tarhana örneği tartılır ve üzerine 25 ml deiyonize su ilave edilmiştir. Su içerisinde iyice homojenize edildikten sonra tüpler çalkalayıcıda 250 rpm'de 4 saat boyunca bekletilmiştir. Tüpler 1900 x g'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra 0.45 mikron filtreden geçirilerek örnekler enjeksiyona hazırlanmıştır.

-Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışma şartları;

Enjeksiyon LC20 AT pompaya sahip DAD dedektörlü Shimadzu LC2040 Prominence Marka HPLC (Tokyo, Japonya) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Mobil faz ise 10 mM NH₄H₂PO₄ (pH 2.6, H₃PO₄) analiz 1 ml/dk akış hızında, 10 µl enjeksiyon hacminde, 40°C kolon sıcaklığında olmuştur. Kolon fırını olarak CTO-10ASVp ve InertSustain C18 5 µm 250 mm *4.6mm kolonu kullanılmıştır. Sonuçlar LC Solution bilgisayar paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Her organik asit için kromatografik şartlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Her bir organik aside ait alıkonma süresi, kalibrasyon denklemi ve LOD değeri.

Table 1: Retention time, calibration curve and LOD for each organic acid.

| Organik asitler | Alıkonma süresi | R ² | Kalibrasyon denklemi | LOD (mg/L) |
|-----------------|-----------------|----------------|----------------------|------------|
| Okzalik asit | 2.69 | 0.999 | y=7727.37+47192.6 | 1 |
| Tartarik asit | 2.99 | 0.999 | y=974.876+31736.8 | 10 |
| Formik asit | 3.27 | 0.999 | y=532.490-22181.8 | 20 |
| Malonik asit | 3.82 | 0.999 | y=572.424x+152.14 | 50 |
| Laktik asit | 4.43 | 0.999 | y=426.337+6448.36 | 100 |
| Asetik asit | 4.87 | 0.999 | y=294.631+10875.3 | 150 |
| Sitrik asit | 5.48 | 0.997 | y=636.586x+9932.65 | 150 |
| Süksinik asit | 6.80 | 0.998 | y=402.428x-1612.75 | 100 |
| Propiyonik asit | 10.57 | 0.999 | y=287.231+2042.74 | 10 |

İstatistik Analiz

Fermantasyonun 0., 3., 5., 7., 9., 11., 13. ve 15. günlerinde ön kurutmanın 1. gününde ve son kurutmanın 1. ve 3. günlerinde örnekler alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda depolama günleri boyunca organik asit düzeylerinde farklılıklar istatistiksel olarak ortaya konmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics Paket programı Version 25 sürümü kullanılmıştır. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildikten sonra önemli bulunması halinde ($p < 0.05$) Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Ayrıca organik asitlerin birbirleriyle olan ilişkilerini belirlemek için Pearson Correlation Testi kullanılmıştır. Analizler 3 paralelli yapılmış olup sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

BULGULAR

Tarhana fermantasyonu sırasında meydana gelen organik asit değişimi Şekil 1'de gösterilmiştir. Fermantasyon ve kurutma süreci boyunca tarhana örneklerinde oksalik asit, formik asit ve malonik asit miktarları tespit limitlerinin altında kalmıştır. Organik asit sonuçları Tablo 2'de

verilmiş olup fermantasyon ve kurutma boyunca meydana gelen değişimler önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Fermantasyonun 0. gününden 15. gününe kadar en yüksek miktarda bulunan organik asidin asetik asit olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Fermantasyonun son gününden itibaren ön kurutma ve son kurutma boyunca laktik asit yüksek miktarda tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Fermantasyonun ilk 13 gününde en fazla miktarda bulunan 3 organik asidin asetik asit, laktik asit ve süksinik asit olduğu belirlenmiştir. ($p < 0.05$). Kurutma süresince Pearson Korelasyon testi sonuçlarına göre tartarik asit sonuçları; laktik asit ($r = 0.740$) ve asetik asit sonuçları ($r = 0.767$) ile korelasyona sahip olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$). Laktik asit sonuçlarının ise asetik asit ($r = 0.911$), sitrik asit ($r = 0.820$) ve propiyonik asit ($r = 0.722$) ile korelasyona sahip olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Asetik asit ise sitrik asit ($r = 0.764$) ve propiyonik asit ($r = 0.464$) ile korele bulunurken sitrik asit sadece propiyonik asit ($r = 0.586$) ile korele bulunmuştur ($p < 0.01$). Sitrik asit ve tartarik asit ($r = 0.385$) arasında korelasyonun önemlilik derecesi 0.05 olarak bulunmuştur. Süksinik asidin ise diğer organik asitlerle bir korelasyona sahip olmadığı bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 2. Fermantasyon ve kurutma boyunca organik asit miktarında meydana gelen değişim ($\mu\text{g/g}$).

Table 2. Change of organic acid amount during fermentation and drying process ($\mu\text{g/g}$).

| | Tartarik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit | Süksinik asit | Propiyonik asit |
|----|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 0 | 868.60±21.20 ^{dH} | 2713.80±66.00 ^{bH} | 4550.00±111.00 ^{aH} | 673.73±16.44 ^{eG} | 1871.10±94.40 ^{cH} | 365.10±8.91 ^{fI} |
| 3 | 1589.40±38.80 ^{dG} | 5913.80±14.00 ^{bG} | 7190.00±175.00 ^{aG} | 432.72±10.56 ^{fH} | 2653.40±64.70 ^{cI} | 1192.60±29.10 ^{eH} |
| 5 | 1965.50±47.90 ^{eE} | 9651.00±23.00 ^{aF} | 9668.00±236.00 ^{aEF} | 1452.00±35.40 ^{dE} | 3080.10±75.10 ^{bE} | 1525.00±37.20 ^{dG} |
| 7 | 2856.20±69.70 ^{dA} | 11114.00±27.00 ^{bE} | 11613.00±283.00 ^{aC} | 901.50±22.00 ^{fF} | 3334.20±81.30 ^{cD} | 2323.90±56.70 ^{eE} |
| 9 | 2522.00±61.50 ^{dBC} | 12072.00±29.00 ^{bC} | 13376.00±326.00 ^{aA} | 1672.80±40.80 ^{eD} | 3720.80±90.80 ^{aB} | 2316.50±56.50 ^{dE} |
| 11 | 2596.60±63.30 ^{dB} | 10971.00±26.00 ^{bE} | 10354.00±253.00 ^{aD} | 1418.60±34.60 ^{eE} | 258.06±6.30 ^{cI} | 2176.30±53.10 ^{dF} |
| 13 | 2498.90±60.90 ^{dC} | 11445.00±27.00 ^{bDE} | 12859.00±314.00 ^{aB} | 1963.00±47.90 ^{eAB} | 3515.00±85.70 ^{cC} | 2406.90±58.70 ^{dE} |
| 15 | 1996.50±48.70 ^{eE} | 11368.00±27.00 ^{aDE} | 10461.00±255.00 ^{bD} | 1856.40±45.30 ^{eC} | 3614.90±88.20 ^{bC} | 2451.80±59.80 ^{dE} |
| 16 | 1920.80±46.80 ^{eE} | 10966.00±26.00 ^{aE} | 9236.00±225.00 ^{bF} | 1399.10±34.10 ^{fE} | 2465.00±60.10 ^{dG} | 5092.50±124.20 ^{cA} |
| 17 | 2161.20±52.70 ^{eD} | 11646.00±28.00 ^{aCD} | 10010.00±244.00 ^{bDE} | 1630.10±39.80 ^{fD} | 3281.40±80.00 ^{dD} | 4622.70±112.80 ^{cB} |
| 19 | 1686.40±41.10 ^{dF} | 12593.00±30.00 ^{aB} | 12747.00±311.00 ^{aB} | 1975.40±48.20 ^{dA} | 3314.50±80.80 ^{cD} | 3895.00±95.00 ^{bD} |
| 21 | 2243.90±54.70 ^{eD} | 13129.00±32.00 ^{aA} | 11885.00±290.00 ^{bC} | 1904.40±46.40 ^{fBC} | 3837.80±93.60 ^{dA} | 4426.70±108.00 ^{cC} |

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a-f(→): Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$). A-I (↓): Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

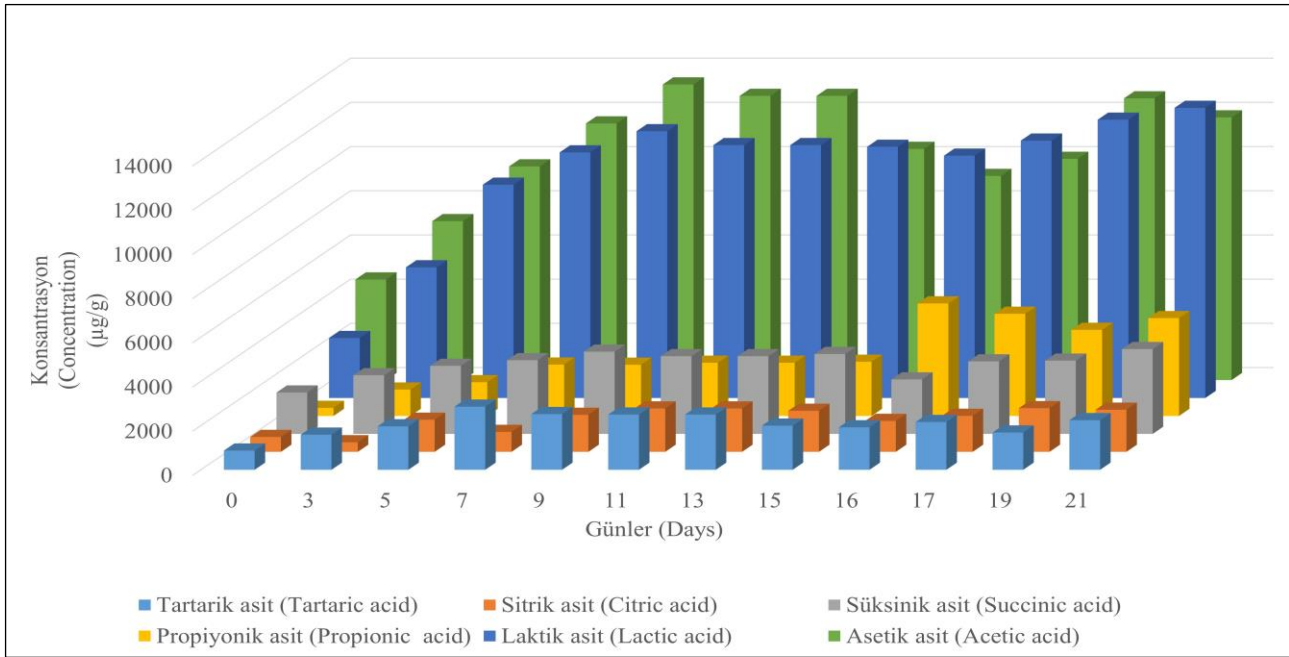
Tablo 3. Pearson Korelasyon Testi sonuçları.

Table 3. Results of Pearson Correlation.

| | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit | Süksinik asit | Propiyonik asit |
|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-----------------|
| Tartarik asit | .740** | .767** | .385* | -.240 | .285 |
| Laktik asit | - | .911** | .820** | -.028 | .722** |
| Asetik asit | | - | .764** | .096 | .464** |
| Sitrik asit | | | - | .161 | .586** |
| Süksinik asit | | | | - | .014 |

** : Pearson Korelasyon Testine göre 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

* : Pearson Korelasyon Testine göre 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 1. Günlere göre organik asit içeriğinin dağılımı.

Figure 1. Distribution of organic acid content for days.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarhanada meydana gelen organik asitler kullanılan ham madde ya da mikroorganizma aktiviteleri sonucunda oluşmaktadır (Kumral 2015). Tarhana fermantasyonunda oluşan başlıca organik asitler; laktik asit, asetik asit ve propiyonik asittir (Bozkurt 2006).

Laktik asit tarhana fermantasyonunda yoğurttan gelebildiği gibi laktik asit bakterileri tarafından karbonhidratların parçalanmasıyla da üretilmektedir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asidin yanında asetik asit, propiyonik asit ve pirüvik asit gibi diğer organik asitleri de üretebilmektedir (Bozkurt ve Gürbüz 2008). Kullanılan sebzelerden kaynaklı sitrik asit de bulunabilmektedir (Erbaş ve ark. 2006). Kumral (2015), fermantasyon süresinin uzadıkça asetik asit miktarının arttığını ve asetik asit ve laktik asidin un çeşidi ve fermantasyon süresinden etkilendiğini ifade etmiştir. Erbaş ve ark. (2006), tarhana fermantasyonu sırasında oluşan laktik asitteki azalmayı propiyonik asit bakterilerinin laktik asidi substrat olarak kullanılmasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Işık Doğan ve Yılmaz (2022), fermantasyonun 0. gününde laktik asit düzeyini Kastamonu Tarhanasında 0.681 g/100 g, Bursa Tarhanasında 0.085 g/100 g tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 7. günün sonunda Kastamonu Tarhanasının laktik asit düzeyini 1.364 g/100 g ulaştığını; Uşak Tarhanasının laktik asit düzeyinin 2.121 g/100 g ulaştığını ifade etmişlerdir. Arslan-Tontul ve ark. (2018) ıslak tarhana örneklerinin laktik asit miktarının ortalama 0.632 g/100 g düzeyinde olduğunu ifade etmişlerdir.

Erbaş ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, ıslak tarhananın organik asit profili incelenmiştir. Araştırmacılar 3 gün sonunda tarhana hamurunun laktik asit miktarının 13.58'den 20.26 g/kg'a, asetik asit miktarının 4.85'ten 7.78 g/kg'a ve propiyonik asit miktarının 2.44'ten 7.58 g/kg'a çıktığını ifade etmişlerdir. Ayrıca araştırmalar fermantasyon sonunda sitrik asitte meydana gelen azalmanın nedenini laktik asit bakterileri ve mayalar tarafından kullanılmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Özel (2021), tarhana hamurunun pasajlayarak tekrar tarhana üretiminde kullanımını araştırdığı bir çalışmada; fermantasyon koşullarının organik asit miktarını etkilediğini ve tavsiye ettiği 3.70 pH ve 25 °C'de pasajlama edilen tarhana hamurunun laktik asit ve asetik asit miktarlarının sırasıyla 945-1106 mg/100g ve 81-94 mg/100g arasında değiştiğini ifade etmiştir. Bozkurt ve Gürbüz (2008), tarhana yapımında kullanılan yoğurt miktarının artmasıyla laktik asit miktarının arttığını ama yoğurt kullanımına bağlı olarak nem ve yağ miktarının artması raf ömrünü olumsuz etkilediğini ifade etmişlerdir.

Gül ve Çon (2019) tarafından yapılan bir çalışmada farklı laktik asit bakterilerinin tarhana fermantasyonunun organik asit profilini nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Araştırmacılar en yüksek laktik asit içeriğini fermantasyonun 7. ve 10. gününde 17942 ve 17878 mg/kg düzeyinde bulmuşlardır. Çalışmamızda ise 21. günde laktik asit miktarı en yüksek seviyeye olan 13129 µg/g ulaşmıştır. Çalışmamız fermantasyon ve kurutma işlemi de kapsadığı ve 21 gün boyunca devam ettiği Gül ve Çon (2019) tarafından yapılan çalışma ile farklılık göstermektedir. Ancak fermantasyon süreci incelendiğinde laktik asidin 9. günde en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmektedir. Aynı çalışmada asetik asit miktarının fermantasyonunun 10. gününde en yüksek düzeye ulaştığı ve sonra düştüğü rapor edilmiş olup bu durumun çalışmamızla benzerlik göstererek asetik asit miktarının fermantasyonunun 9. gününden itibaren düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Propiyonik asit bulgularımızın Gül ve Çon (2019) tarafından yapılan çalışmaya kıyasla benzer şekilde arttığı ancak araştırmacıların 15 günlük fermantasyon sonunda propiyonik asit içeriğini 4006 mg/kg olarak bulurken çalışmamızda ise 2451 µg/g düzeyinde bulunmuştur.

Magala ve ark. (2014) ıslak tarhana örneklerinin süksinik asit düzeyinin fermantasyonunun 2. gününden sonra neredeyse sabit kaldığını söylemişlerdir. Benzer bu durum çalışmamızda da karşılaşılmıştır. Ayrıca araştırmacılar fermantasyonunun 6. gününde süksinik asit düzeyinin 1.286-1.384 g/100 g olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, tarhanada bulunan *L. alimentarius* ve *P. kudriavzevii*'nin laktik, süksinik ve asetik asitlerinin birikmesinde etkili oldukları ve sinerjistik etki göstererek tarhana örneklerinde güçlü bir korelasyona sahip olduğu belirtilmiştir (Özdemir ve ark. 2018). Benzer bir çalışmada, tarhanada kullanılan *L. farciminis*, *P. kudriavzevii* ve *L. alimentarius* laktik asit bakterisinin tarhanada sırasıyla laktik asit, süksinik asit ve asetik asit üretiminden sorumlu olduğu ifade edilmiştir (Yazıcı 2016).

5 adet geleneksel ve 4 adet ticari olarak üretilmiş toplam 9 adet Uşak tarhanasının fermantasyon boyunca organik asit profilinin araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek düzeyde bulunan organik asitlerinin laktik ve süksinik asitleri olduğu ve bu organik asitleri asetik asit izlediği bulunmuştur (Yazıcı 2016). Bu bulgular çalışmamızla benzer olarak, fermantasyon boyunca laktik, süksinik ve asetik asit fermantasyonla birlikte arttığı görülmüştür.

Bozkurt ve Gürbüz (2008), tarafından yapılan çalışmada, araştırmacılar sitrik asidin fermantasyonla değil çeşitli sebzelerden dolayı tarhanada bulunabileceğini ifade etmişlerdir. Bulgularımızda da sitrik asit miktarının diğer organik asitlerle kıyaslandığında genellikle en düşük olduğu fermantasyon boyunca meydana gelen artışın da diğer organik asitlerin kısmi buharlaşmasından kaynaklandığı görülmüştür (Erbaş ve ark. 2006). Bulgularımızın daha önceki Erbaş ve ark. (2006), Magala ve ark. (2013) ve Özdemir (2016) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızla benzerlik gösteren bir çalışmada Isparta, Maraş ve Uşak Tarhanalarında fermantasyon boyunca formik asit oluşumunu gözlemlenmediği belirtilmektedir (Işık Doğan ve Yılmaz 2022).

Çalışmamızda tarhana fermantasyonu ve kurutma sürecinde organik asit profilinde meydana gelen değişimi ortaya konulmuştur. Tarhana fermantasyonu sırasında oluşan laktik asit yoğurt gibi fermente süt ürünlerinden gelebildiği gibi fermantasyon sırasında karbonhidratların parçalanmasıyla da oluşmaktadır. Çalışmamız literatür ile uyum göstererek laktik asit ve asetik asidin tarhana fermantasyonunda bulunan başlıca organik asitler olduğunu ortaya koymuştur. Kurutma sırasında propiyonik asit miktarının önemli düzeyde arttığı bulunmuştur. Tarhana fermantasyonunda okzalik, malonik ve formik asit düzeylerinin dedeksiyon limitinin altında kaldığı görülmüştür. Tarhana fermantasyonunun daha çeşitli organik asitlerle çalışılması bu konuda bilgilerin tazelenmesi ve eksiklerin giderilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Yazar, laboratuvar alt yapısının kullanıldığı Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Süt Ürünleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne teşekkürlerini sunmaktadır.

Bu araştırma, kamu, ticari veya kâr amacı gütmeyen kuruluşlardan herhangi bir özel hibe almamıştır.

Çalışmada herhangi bir hayvan veya insan materyali kullanılmamasından dolayı yazar etik kurul iznine tabi olmayan çalışma olduğunu beyan etmektedir.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: AS
Denetleme/Danışmanlık: AS
Veri Toplama ve/veya İşleme: AS
Analiz ve/veya Yorum: AS
Makalenin Yazımı: AS
Eleştirel İnceleme: AS

KAYNAKLAR

- Arslan-Tontul S, Mutlu C, Candal C, Erbaş M (2018). Microbiological and chemical properties of wet Tarhana produced by different dairy products. *J Food Sci Technol*, 55 (12), 4770-4781.
- Atar Ş, Özsisli B (2022). Determination Of Some Characteristics Of Traditional Beyşehir Tarhana Production With Poppy Seed Substitution. *Türk Tarım Gıda Bilim Teknoloji Derg*, 10 (7), 1293-1299.
- Bozkurt O (2006). Farklı üretim yöntemlerinin tarhananın organik asit içeriği üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye.
- Bozkurt O, Gürbüz O (2008). Comparison of lactic acid contents between dried and frozen tarhana. *Food Chem*, 108 (1), 198-204.
- De Vuyst L, Leroy F (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microb Physiol*, 13 (4), 194-199.
- Demirci AS, Palabiyik I, Ozalp S, Tirpanci Sivri G (2018). Effect of using kefir in the formulation of traditional Tarhana. *Food Sci Technol (Campinas)*, 39, 358-364.
- Erbaş M, Uslu MK, Erbaş MO, Certel M (2006). Effects of fermentation on the organic and fatty acid contents of tarhana, a Turkish fermented cereal food. *J Food Compos Anal*, 19 (4), 294-301.
- Gohari ST (2022). The effects of quinoa and chickpeas flours on the physical, chemical, functional and sensorial properties of tarhana soup. *Egypt J Basic Appl Sci*, 10 (35), 5-28.
- Göncü A (2020). Tarhana üretiminde farklı mercimek unları ve boza kullanım olanaklarının araştırılması. Doktora tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Gül LB, Çon AH (2019). Technological properties of some lactic acid bacteria and interactions with *Saccharomyces cerevisiae* PFC121 in tarhana dough during fermentation. *J Biosci Biotechnol*, 8 (1), 7-16.
- Işık Doğan Ö, Yılmaz R (2022). Multi-omics analysis of the microbiome and metabolome in different types of traditional tarhana fermentation. *SSRN*, 4216331.
- Karahan AM, Köten M, Karahan LE, Yazman MM (2019). Tarhananın besinsel önemi ve fonksiyonel bileşenlerce zenginleştirilmesi. *Humder*, 4 (3), 120-129.
- Kömürcü TC, Bilgiçli N (2022). Effect of ancient wheat flours and fermentation types on tarhana properties. *Food Biosci*, 50, 101982.
- Kumral A (2015). Nutritional, chemical and microbiological changes during fermentation of tarhana formulated with different flours. *Chem Cent J*, 9 (1), 1-8.
- Magala M, Kohajdová Z, Karovičová J (2013). Preparation of lactic acid bacteria fermented wheat-yoghurt mixtures. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 12 (3), 295-302.
- Magala M, Kohajdová Z, Karovičová J, Greifová M, Greif G (2014). Application of Lactic Acid Bacteria as Starter Culture for Tarhana Fermentation. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 3 (6), 498-504.
- Özdemir N (2016). Uşak tarhanasının aroma bileşimi ve mikroflorası ile ilişkisinin belirlenmesi. Doktora tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Özdemir N, Yazıcı G, Şimşek Ö, Özalp SG, Çon AH (2018). The effect of lactic acid bacteria and yeast usage on aroma development during tarhana fermentation. *Food Biosci*, 26, 30-37.
- Özel B (2021). Yarı sürekli sistemde tarhana hamuru üretimi için aşılama materyali fermantasyonunun optimizasyonu. Doktora tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Soyuçok A, Yurt MNZ, Altunbas O, Ozalp VC, Sudagidan M (2021). Metagenomic and chemical analysis of Tarhana during traditional fermentation process. *Food Bio*, 39, 100824.
- Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS ve ark. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19 (1), 184-217.
- Tangüler H (2014). Traditional Turkish fermented cereal based products: Tarhana, boza and chickpea bread. *Türk Tarım Gıda Bilim Teknoloji Derg*, 2 (3), 144-149.
- Tuluk K, Ertaş N (2019). The effects of different gluten-free flours on the physical, chemical, functional and sensorial properties of tarhana. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Derg*, 23 (3), 301-312.
- Yazıcı G (2016). Uşak tarhanasının organik asit içeriğinin laktik asit bakterisi çeşitliliği ile ilişkisinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.



Elma (Malus Pumila) Katkısının Yonca Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi

Doğancan ERİŞÇİ¹  Nuriye Tuğba BİNGÖL²  Abdurrahman AVCİ^{1,*} 

¹ Çaldıran Directorate of District Agriculture and Forestry, 65970, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, 65080, Van, Turkey

Received: 07.10.2022

Accepted: 06.11.2022

ÖZ

Bu araştırmada, taze yoncaya %5 ve %10 oranında elma katılarak yapılan yonca silajının kalite parametreleri değerlendirildi. Bu amaçla, %5 oranında buğday samanı ilavesiyle kuru maddesi artırılan yoncaya iki farklı düzeyde Altın çekirdek elması ilave edilerek laboratuvar siloları hazırlandı. Kontrol grubu ve deneme grupları 10 tekrardan oluşturuldu. 1 litrelik kavanozlarda hazırlanan silajlar 60 gün sonra açıldı. Silaj numunelerinde fiziksel ve kimyasal analizler yapıldı. Koku, dış görünüş ve renk değerlendirmesinde bütün silajlar "Orta kalite" olarak puan aldı. Yonca silajına elma ilavesinin kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), asit deterjan lif (ADF) ve nötral deterjan lif (NDF) içeriğine etkisinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi. Silajların pH değerlerinin 5.46 - 5.72 arasında olduğu, ancak gruplar arasında önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi. Silajlarda laktik asit (LA) düzeyinin %10 elma katkısı ile önemli derecede yükseldiği, asetik asit (AA) ve propiyonik asit (PA) düzeyinin önemli derecede düştüğü belirlendi ($p < 0.05$). Bütirik asit düzeyinde ise gruplar arasında önemli bir farklılık olmadığı görüldü. %10 Elma katılan silajların toplam azot içerisindeki amonyağa bağlı azot ($\text{NH}_3\text{-TN}$) oranları kontrol grubu silajlara göre önemli derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). Sonuç olarak, yonca silajına katılan %10 düzeyindeki elmanın silaj kalitesini iyileştirdiği, ancak ileride yapılacak çalışmalarda kuru madde düzeyi daha yüksek yonca silajlarında elma katkısıyla daha iyi sonuçlar alınabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Elma, Kalite, Katkı, Silaj, Yonca.

ABSTRACT

The Effect of Apple (Malus Pumila) Additive on Alfalfa Silage Quality

In this research, the quality parameters of alfalfa silage made by adding 5% and 10% apples to fresh alfalfa were evaluated. For this purpose, laboratory silos were prepared by adding two different levels of Altınçekirdek apples to the alfalfa dry matter was increased with the addition of 5% wheat straw. The control group and experimental groups were formed from 10 replications. The silages prepared in one liter jars were opened after 60 days. Physical and chemical analyzes were made on silage samples. All silages were scored as "Medium quality" in terms of odor, appearance and color. It was determined that the effect of adding apple to alfalfa silage on dry matter (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) content was not statistically significant compared to the control group. It was detected that the pH values of the silages were between 5.46 - 5.72, but there was no significant difference between the groups. It was determined that lactic acid (LA) level increased significantly with 10% apple addition, and acetic acid (AA) and propionic acid (PA) levels decreased significantly in silages ($p < 0.05$). It was observed that there was no significant difference in butyric acid level between groups. Ammonia-bound nitrogen ($\text{NH}_3\text{-TN}$) ratios in total nitrogen of silages containing 10% apple were found to be significantly higher than the control group silages ($p < 0.05$). As a result, it has been concluded that 10% apples added to alfalfa silage improved the silage quality, but in future studies, better results can be obtained with the addition of apple in alfalfa silages with higher dry matter levels.

Keywords: Additive, Alfalfa, Apple, Silage, Quality.

GİRİŞ

Yonca, baklagil yem bitkileri içerisinde çok yıllık ve yıl içerisinde çok biçimli bir bitki olup, başta protein olmak üzere, besin maddeleri yönünden zengin lezzetli bir yem bitkisidir (Ergün ve ark. 2011; Orak ve Gökkaya 2014).

Yaprak yönünden zengin ve ot verimi oldukça yüksek olan yonca, yaprak saplarının ince ve zayıf olması sebebiyle, kurutulmasından hayvanlara yedirilmesi aşamasına kadar geçen sürede önemli besin madde kayıpları oluşmakta veya fazla yağış alan bölgelerde kurutmanın tam olarak yapılamaması nedeniyle, küflenme ve mikrobiyal bozulma



nedeniyle önemli besin madde kayıpları oluşmaktadır (Ergün ve ark. 2011; Orak ve Gökkaya 2014). Söz konusu fiziksel ve mikrobiyolojik kayıpların önlenmesi için yonca otunun suda çözünebilir karbonhidrat içeriği yüksek bir materyal ile silolanması bir çözüm olabilmektedir. Yoncanın kolay çözünebilir karbonhidratlar yönünden yetersiz oluşu ve tampon kapasitesinin yüksekliği sebebiyle silolanırken katkı maddelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Kurtoğlu 2008; Mut ve ark. 2020). Bu amaçla, melas, tahıl taneleri ve bazı yem bitkileri gibi kolay çözünebilir karbonhidrat kaynaklarının ilavesi (Daş ve ark. 2022) fermantasyon inhibitörü olarak organik asitler (Ke ve ark. 2017) veya fermantasyonu iyileştirmek için bakteriyel inokulantlar (Koç ve ark. 2017; Kızılsimşek ve ark. 2020; Besharati ve ark. 2021) kullanılması yonca silajında istenen fermantasyonu sağlamaktadır. Yine bu katkılara alternatif olarak şeker içeriği yüksek meyve posaları da bu amaçla kullanılmaktadır.

Canbolat ve ark. (2010), yonca silajına değişik düzeylerde üzüm posası ilave ettikleri çalışmalarında; Silaja eklenen üzüm posası miktarı arttıkça ham protein, ham kül, NDF ve ADF düzeylerinin azaldığı, suda çözünen karbonhidrat, ham yağ ve polifenol miktarlarını arttığı belirtilmiştir ve üzüm posasının yonca silajında karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmak istenildiğinde 160-200 g/kg (KM) oranında kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Karbonhidrat kaynağı olarak gladiçya meyvesinin yonca silajında kullanılabilirliğini belirlemek için laboratuvar koşullarında hazırlanan silajların fermantasyon, aerobik stabilite, in-vitro gaz üretimi, mikrobiyolojik özellikleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada (Canbolat ve ark. 2013), taze yonca materyaline 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 g/kg (KM) oranlarında gladiçya meyvesi katılmıştır. Katkılı silajlarda, ham protein, ham yağ, ham kül, NDF ve ADF oranının azaldığını, suda çözünebilir karbonhidrat ve toplam besin maddesi içeriğini arttığı bildirmiştir. Bu araştırma sonunda, yoncada karbonhidrat kaynağı olarak 80 ile 100 g/kg (KM) düzeyinde gladiçya meyvesini kullanılabilceği rapor edilmiştir.

Kolay çözünebilir karbonhidratlar bakımından zengin bir meyve olan elma bu özelliği dolayısıyla önemli bir potansiyele sahiptir. Bütün bir elma yaklaşık %15 düzeyinde karbonhidrat içermektedir. Elma, çeşitlere, yetiştirildiği bölgelere ve depolama sürelerine bağlı olarak değişimle birlikte, ortalama %15-16 kuru madde (KM) (Campeanu ve ark. 2009), %10-12 toplam şeker (Ali ve ark. 2004; Campeanu ve ark. 2009; Lee 2012; Begic-Akagic ve ark. 2014) ve %11-12 toplam asit (Hecke ve ark. 2006) içermektedir. Taze elma suyunun pH değeri ise 3.23 ile 6.54 arasında değişmektedir.

Çiftçi ve ark. (2005), elmanın yonca silajına, şeker ve arpa kırığı yerine eklenmesinin araştırıldığı çalışmada; %1 şeker, %10 arpa kırığı ve %10 elma katkı gruplarının üçünün de silaj kalitesinin iyi olduğu, ADF ve NDF seviyelerinin besin maddesi içeriklerinin benzer olduğu, pH ve amonyak sonuçları bakımından önemli bir farklılık görülmediği belirtilmiştir. Yonca benzeri bitkilerin silaj yapılması sırasında elma gibi şeker oranı fazla olan meyvelerin silaja kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak eklenebileceği sonucuna varmışlardır.

Özellikle pazar değeri ve tüketime sunulma özelliği düşük bazı yerel elma türlerinin sezonda yüksek miktarda üretilmesi ve aynı oranda tüketime sunulmaması dolayısıyla, silajlarda suda çözünebilir karbonhidrat kaynağı olarak kullanılabilmektedir. "Altın çekirdek" adlı elma çeşidinin yukarıda belirtilen özelliklerden şeker oranının yüksekliği, asit bir yapıya sahip olması, pH ve

ekonomik değerinin düşük olması nedeniyle, zor silolanabilen yonca silajına kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması fikrini doğurmuştur.

"Altın çekirdek elması" Rosaceae familyasından, malus pumila türü içinde anılan soğuk ve ılıman iklime adapte olan bir meyvedir. Diğer meyve türlerindeki elma çeşitleri 1 yıl verimli, ertesi yıl verim çok düşük iken, Altın çekirdek elmasının hem her yıl yüksek verim vermesi, hem de diğer türlere ait çeşitlerde iç kurdu zararı görülürken, bu çeşitte buna rastlanmaması özelliği yetiştirici tarafından gözlenen önemli özelliklerindedir. Tüm bu özelliklerine rağmen hali hazırda sofralık özelliğini kaybetmesi ve pazar değerinin düşmesi dolayısıyla yetiştiriciliğine yönelik çok talep olmamakta ve bu özellikleri dolayısıyla hayvan yemi olarak kullanılması hem yem çeşitliliğinin artmasını sağlamak hem de üretim maliyetinin düşüklüğü ile ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşüncesini oluşturmuştur.

Bu araştırma, yonca silajına farklı oranlarda katılan elmanın, silajın fermantasyon kalitesi ve besin madde içeriği üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu'ndan 01.09.2022 tarihinde Karar No: 2022/08-16 sayılı yazıyla etik izni alınmasına ihtiyaç yoktur onayı alınmıştır.

Silajların Hazırlanması

Araştırmada kullanılan yonca, çiçeklenme döneminin başlangıcında Van'ın Muradiye İlçesinde 2019 yılının haziran ayında hasat edildi. Altın çekirdek çeşidi elma ise yine Van piyasasından temin edildi. Ot doğrama makinesinde 1-3 cm uzunluğunda doğranan yoncaya %5 oranında buğday samanı kuru maddeyi arttırmak amacıyla ilave edildi. Kuru maddesi buğday samanyla artırılmış yonca silaj yapılmak için 3 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol grubudur sadece yonca ve buğday samanından oluşmaktadır. 2. grupta ise yonca materyalinde ağırlık esasında göre %5 oranında elma katılmış gruptur. 3. grup ise yine aynı yonca materyaline ağırlık esasına göre %10 oranında elma eklenmiş gruptur. Kontrol ve deneme olarak toplamda 3 grubun her birinden 10 tekrar olacak şekilde 30 adet örnek 1 lt'lik ağzı kapaklı cam kavanozlara 850 g ağırlık standardına göre sıkıştırılarak dolduruldu. Ağzı sıkıca kapatılan cam kavanozlar hava almayacak şekilde bantlanarak 45 gün süreyle ışık görmeyen bir odada fermantasyona bırakıldı.

Fiziksel Özellikler

Kırk beş gün sonra kavanozlar açılarak örnekler alındı ve fiziksel değerlendirmesi (renk, strüktür ve koku) Alçiçek ve Özkan (1997)'in bildirişine göre yapıldı. Silajlara ait kuru madde ve pH değerleri belirlendikten sonra, Fleig skorları ve kalite derecelendirmesi de yapılmıştır (Kılıç 1986).

Analitik Yöntemler

Silolama sonucunda açılan silaj kavanozlarından alınan örnekleri pH değerleri pH metre ile belirlendi. Örneklerde Kuru madde (KM) düzeyi A.O.A.C (1990)'a göre, ham protein (HP) analizleri, Akyıldız (1984)'in bildirdiği Kjeldahl yöntemi ile Asit Deterjan Lif (ADF) ve Nötral Deterjan Lif (NDF) analizleri ise Van Soest ve ark. (1991)'na göre ANKOM Fiber Analyzer cihazı ile yapıldı. Derin dondurucuda -18°C'de dondurulmuş olan silaj sıvısı örnekleri çözülerek asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit analizi Leventini ve ark. (1990)'nın

bildirdiği yöntemle göre, HPLC cihazı kullanılarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

İstatistik Analiz

Çalışmada elde edilen veriler, SPSS (2006) paket programında ONE-WAY ANOVA prosedürüne göre analiz edilmiş, gruplar arası farklılığın belirlenmesinde Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. İstatistiksel önem derecesi $p < 0.05$ 'e göre değerlendirilmiştir (Düzyüneyş ve ark. 1983).

BULGULAR

Elma ilavesi yonca silajının besin madde ve kimyasal kompozisyonuna tesiri Tablo 2'de sunulmuştur. Yapılan çalışmada; yonca silajına kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak farklı oranlarda elma ilavesinin, yonca silajına ait besin maddeleri üzerine etkisinin istatistiksel bir önemi olmadığı belirlenmiştir. Kontrol ve deneme gruplarına ait KM oranları sırasıyla; 213.74, 213.38, 205.17 g kg^{-1} KM olarak belirlenmiştir.

Yonca silajına ilave edilen elmanın, silaj kimyasal kompozisyonu üzerine etkileri değerlendirildiğinde; silaj pH değeri ve organik asitlerinden bütirik asit içeriği bakımından gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığı

tespit edilmiştir. Fakat, silaj NH₃N-TN, organik asitlerden; laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit içerikleri bakımından ise gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Silaj NH₃N-TN bakımından kontrol grubunun (29.99±1.51), %10 elma ilave edilen gruba (22.31±2.60) kıyasla daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. Silaj laktik asi bakımından %10 elma ilave edilen grubun (8.87±1.32), kontrol grubu (4.75±0.62) ve %5 elma ilave edilen gruba (3.78±0.26) göre daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Asetik asit açısından ise silaj kontrol grubunun (49.73±2.21), %10 ilave edilen deneme grubuna (39.92±2.38) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Silaj propiyonik asit bakımından kontrol grubunun (13.01±1.07), Yonca + %5 elma (5.69±0.45) ve Yonca + %5 Elma (7.84±1.06) gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Silajların Fleig Puanına göre kalite sınıflandırılması ise Tablo 4'de sunulmuştur. Silajlara ait KM ve pH değerleri kullanılarak elde edilen Fleig puanı, yonca silajında (kontrol) %23.22 olarak belirlenirken, Yonca + %5 Elma silajı ve Yonca + %10 Elma silajlarında ise sırası ile %23.65 ve %23.28 olarak belirlenmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 1. Yonca, buğday samanı ve elma'nın besin madde kompozisyonları, (KM).

Table 1. Nutrients composition of alfalfa, wheat straw and apple, % (DM).

| Besin Maddeleri | Yonca | Buğday Samanı | Elma |
|-----------------|--------|---------------|--------|
| KM | 19.44* | 90.63 | 17.25* |
| HK | 9.42 | 9.88 | 4.81 |
| HP | 9.20 | 2.04 | 3.13 |
| OM | 90.58 | 90.12 | 94.26 |
| ADF | 25.59 | 36.48 | 8.59 |
| NDF | 33.82 | 67.15 | 6.45 |

*: Yaş Materyal, KM: Kuru madde, HK: Ham kül, HP: Ham protein, OM: Organik madde, ADF: Asit deterjan lif, NDF: Nötral deterjan lif.

Tablo 2. Yonca silajlarının besin maddeleri ve kimyasal kompozisyonu (g kg^{-1} KM).

Table 2. Nutrients and chemical composition of alfalfa silages (g kg^{-1} DM).

| | Yonca (Kontrol) | Yonca + %5 elma | Yonca + %10 elma | p< |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------|
| Besin Maddeleri | | | | |
| KM | 213.74±1.74 | 213.38±3.02 | 205.17±3.92 | 0.096 |
| HP | 100.11±1.97 | 112.51±5.57 | 104.64±4.03 | 0.119 |
| HK | 109.07±1.57 | 107.99±1.74 | 103.51±2.24 | 0.102 |
| ADF | 388.03±4.19 | 382.87±6.33 | 372.68±5.19 | 0.135 |
| NDF | 525.39±4.60 | 523.42±7.23 | 526.23±5.98 | 0.944 |
| OM | 890.93±1.57 | 892.01±1.74 | 896.49±2.24 | 0.102 |
| Kimyasal Kompozisyon | | | | |
| pH | 5.72±0.09 | 5.57±0.07 | 5.46±0.11 | 0.142 |
| NH ₃ N-TN* | 29.99±1.51 ^a | 24.07±2.55 ^{ab} | 22.31±2.60 ^b | 0.060 |
| LA | 4.75±0.62 ^b | 3.78±0.26 ^b | 8.87±1.32 ^a | 0.001 |
| AA | 49.73±2.21 ^a | 41.99±3.32 ^{ab} | 39.92±2.38 ^b | 0.037 |
| PA | 13.01±1.07 ^a | 5.69±0.45 ^b | 7.84±1.06 ^b | 0.000 |
| BA | 31.53±1.84 | 32.58±1.92 | 36.21±2.46 | 0.268 |

^{a,b}: Aynı satırda değişik harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$). KM: Kuru Madde, HP: Ham Protein, HK: Ham Kül, ADF: Asit Deterjan Lif, NDF: Nötral Deterjan Lif, OM: Organik Madde, NH₃N-TN*: Toplam azot içerisinde amonyağa bağlı azot, %, LA: Laktik Asit, AA: Asetik Asit, PA: Propiyonik Asit, BA: Bütirik Asit, g/kg KM.

Tablo 3. Fiziksel özelliklerine göre silajların puanlaması ve kalite sınıflandırması.**Table 3.** Scoring and quality classification of silages according to their physical properties.

| | Koku | Puan | Dış Görünüş | Puan | Renk | Puan | Toplam | Kalite |
|------------------------|---|------|--|------|---|------|--------|--------|
| Kontrol | Kuvvetli bütirik asit kokusu, NH ₃ -kokusu | 2 | Yaprakların yapısı biraz bozulmuş | 2 | Renk çok az değişmiş (sarıdan kahverengiye) | 1 | 5 | Orta |
| Yonca+ %5 Elma | Kuvvetli bütirik asit kokusu, NH ₃ -kokusu | 2 | Yaprakların yapısı biraz bozulmuş | 2 | Silolandığı andaki rengini koruyor (soldurulmuş silajda kahverengi) | 2 | 6 | Orta |
| Yonca+ %10 Elma | Kuvvetli bütirik asit kokusu, NH ₃ -kokusu | 2 | Yaprak ve sapların yapısı bozulmuş, küflü ve kirli | 1 | Silolandığı andaki rengini koruyor (soldurulmuş silajda kahverengi) | 2 | 5 | Orta |

Tablo 4. Silajların Fleig puanına göre kalite sınıflandırması.**Table 4.** Quality classification of silages according to Fleig score.

| Gruplar | KM, % | pH | Fleig Puanı | Kalite Sınıfı |
|------------------------|---------------------|-------|-------------|---------------|
| Yonca Silajı | 21.41 ^a | 5.72 | 23.22 | Düşük Kalite |
| Yonca +%5 Elma Silajı | 21.25 ^{ab} | 5.57 | 23.65 | Düşük Kalite |
| Yonca +%10 Elma Silajı | 20.57 ^b | 5.46 | 23.28 | Düşük Kalite |
| p< | 0.082 | 0.814 | 0.984 | |

a,b: Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ruminant beslenmesinde önemli yeri olan, fakat silaj yapılması diğer bitkilere göre daha zor olan yoncanın, silaj fermantasyonu ve kalitesini arttırmak amacıyla kuru maddesi %5 oranında buğday samanıyla desteklenerek (Kontrol grubu), suda eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak Altın çekirdek çeşidi elmanın %5 (Yonca + %5 elma) ve %10 oranında (Yonca + %10 elma) elma ilave edilmesi ile hazırlanan silaj gruplarının, besin maddeleri ve kimyasal kompozisyon değerleri Tablo 2'de mevcuttur. Tablo incelendiğinde elma ilavesinin yonca silajının besin maddeleri üzerine istatistiksel olarak etkisinin olmadığı, diğer yandan elma katkısının yonca silajının kimyasal kompozisyonunu önemli derecede etkilediği belirlenmiştir (P<0.001). Silajlara ait kuru madde değerleri Yonca (Kontrol), Yonca +%5 Elma ve Yonca+ %10elma gruplarında sırasıyla %21.37, %21.34 ve %20.52 olarak tespit edilmiştir. Yonca silajının kuru madde içeriği her ne kadar istatistiksel olarak benzer olsa da elma katkısı arttıkça rakamsal olarak azalmıştır. Bu azalmanın sebebi elmanın kuru maddesinin (%17.25), taze yoncanın kuru maddesine (%19.44) göre daha düşük olmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada elma katkısı yapılan yonca silajlarının ham protein değerleri birbirine benzerlik göstermektedir. Nitekim önceki benzer çalışmalar da bunu destekler niteliktedir. Çiftçi ve ark.'nın (2005), yaptığı çalışmada yonca silajına ilave edilen %1 şeker, %10 arpa ve %10 elma gruplarında ham protein değerleri yonca silajının ham protein değerleriyle istatistiksel olarak benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada ham kül değerlerine bakıldığında istatistiksel manada bir önemlilik olmamakla birlikte, en yüksek ham kül miktarı (%10.91) Yonca (Kontrol) grubunda belirlenirken en az ham kül miktarı ise (%10.35) Yonca +%5 elma grubunda tespit edilmiştir. Silaj gruplarında elma miktarı çoğaldıkça ham kül miktarının azaldığı görülmüştür. Doğan (2019), yaptığı çalışmada %5 ve %10 elma posası katılan yonca silaj gruplarında değişen ham kül miktarlarının benzer olduğu ve rapor ettiği sonuçların sunulan çalışmayı destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Yine Çiftçi ve ark. (2005), silaj materyali olarak taze yonca kullandıkları çalışmalarında, %10 elma, %1 şeker ve %10 arpa kırması katkıları ile hazırladıkları silajların ham kül içeriklerini sırasıyla %14.87, %14.15 ve %14.39 olarak benzer bulmuşlardır. Bulunan değerler sunulan çalışmanın ham kül değerlerinden yüksek olmakla birlikte, her iki çalışmada da gruplar arasındaki ham kül değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur.

ADF miktarı, silajların sindirilme derecesiyle alakalı bilgiler veren önemli bir parametredir. ADF miktarı ne kadar yüksekse o yemin sindirilme derecesi ise o kadar azdır. Mevcut çalışmada elma ilavesiyle yonca silajının ADF miktarının düştüğü, fakat istatistiksel olarak benzer olduğu, Yonca, Yonca+%5 elma ve Yonca+%10 elma silajlarında sırasıyla %38.80, %38.29 ve %37.27 olduğu tespit edilmiştir. Nitekim Yakışır ve Aksu (2019), yaptığı çalışmada belli oranlarda MKŞPP ilave edilen yonca silajının ADF miktarının önemli ölçüde düştüğünü ve sindirilebilirlik derecesinin arttığını bildirmiştir. Ancak sunulan çalışmada taze yonca %25.59 ADF oranına sahipken, %8.59 ADF değerine sahip elmayla silaj yapıldığında ortaya çıkan elma katkılı silajın ADF oranında beklenen düşüş olmamış ve grupların ADF düzeyinin

benzer olduğu belirlenmiştir. Çiftçi ve ark.'nın (2005), yoncaya elma katarak yaptıkları silajlarda ADF değerlerinin diğer gruplarla aynı olduğunu bildirdikleri çalışma sunulan çalışma ile benzer sonuçlar içermektedir. Duru (2019), yaptığı çalışmada yoncaya değişik oranlarda eklediği lavantanın ADF değerlerinin istatistiksel olarak bir farklılık olmadığını rapor etmiştir. Benzer şekilde Doğan (2019), yaptığı çalışmada yoncaya %5, %10 ve %15 oranlarında elma posası ilave edilen silajlarda ADF değerlerinin önemli ölçüde değişmediğini belirlemiştir. Sunulan çalışmada bildirilen ADF değerleri diğer literatür bildirimleriyle uyumludur.

NDF değeri hayvanın yiyebileceği yem ölçüsünü gösterdiğinden, NDF yüzdesi yükseldikçe, lif içeriği arttığı için hayvanlarda yem tüketimi azalır. Bu çalışmada Elma katkısı, yonca silajının NDF değerini istatistiksel olarak değiştirmezken rakamsal olarak yükselişin olduğu tespit edilmiştir. Elma organik madde açısından zengin bir meyvedir (%94.26). Taze yoncayla birlikte silaj yapıldığında silajların organik madde bakımından artması beklenir. Silaj gruplarında elma katkısı arttıkça rakamsal olarak bir artışın olduğu, fakat istatistiksel olarak bu artışın önemli olmadığı ve organik madde açısından silajların benzer olduğu belirlenmiştir.

Yonca (Kontrol), Yonca + %5 Elma ve Yonca + %10 Elma silaj gruplarının pH değerleri sırasıyla 5.72, 5.57 ve 5.46 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak her üç silajın da aralarında pH değeri yönünden farklılık bulunmamıştır. Rakamsal olarak pH yönünden düşüş olsa da elma katkılı silajlarda beklenen pH düşüşü tespit edilmemiştir. Doğan (2019), yaptığı çalışmada Kontrol, %5, %10 ve %15 elma katkılı yonca silajlarının pH değerleri sırasıyla 4.65, 4.30, 4.23 ve 4.18 olarak bulunmuş ve saf yonca silajına oranla pH değerlerinin istatistiksel olarak önemli derecede düştüğünü belirlemiştir. Canbolat ve ark. (2013), karbonhidrat kaynağı olarak gladiçya meyvesini taze yonca materyaline 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 g/kg (KM) oranlarında kattığı çalışmalarında, pH değerinin tüm gruplarda artan meyve miktarı ile doğru orantılı olarak önemli düzeyde düştüğünü belirtmişlerdir. Kontrol grubunda 5.37 olan pH değerinin artan meyve katkılı her grupta gittikçe önemli oranda düşerek 100 g/kg kullanılan en son grupta pH'nın 4.17' ye kadar düştüğünü bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda karbonhidrat kaynağı meyve katkılarının pH'yı genel olarak düşürdüğü bildirilmiştir. Bu sonuçlar mevcut çalışmanın sonuçları ile uyumlu değildir. Sunulan çalışmada pH'da beklenen düşüşün sağlanamayışı, silaj materyali olarak kullanılan yoncanın kuru madde içeriğinin (%19.44) düşük oluşundan kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim kullanılan ilk biçim yoncanın besin madde analizleri de (HP: %9.20, ADF: %25.59 NDF: 33.82) vejetasyonun erken döneminde biçilmiş olabileceği kanısını güçlendirmektedir. Şöyle ki, pH değerlerinin verildiği ve katkı olarak kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı meyve ve posalarının kullanıldığı silajların yapıldığı yonca ana materyali ile kıyaslandığında, sunulan çalışmanın yonca materyalinin bu çalışmalardaki yoncalardan (%22-34 KM) oldukça düşük kuru maddeye sahip olduğu görülmektedir.

Silajlara ait NH₃N-TN değeri Yonca (Kontrol), Yonca +%5 Elma ve Yonca +%10 Elma gruplarında sırasıyla %29,99, %24,07 ve %22 olarak tespit edilmiştir. Bu değer %5 ve %10 oranında elma katkısı olan silajlarda giderek düşmüş ve de %10 katkılı silajda kontrol silajına göre önemli oranda düştüğü görülmüştür. Benzer şekilde, Canbolat ve ark. (2013), yonca silajına gladiçya meyvesi katarak yaptıkları çalışmalarında, meyve katılan gruplardaki,

meyve katkı oranı arttıkça NH₃N-TN değeri önemli ölçüde düşmüştür. Bu etkinin, gladiçya meyvesinin yapısında bulunan tanenin, silolama başlangıcında çözünebilir proteinlerle kompleks bileşikler oluşturduğu ve böylece proteinlerin mikroorganizmalar tarafından parçalanmasını önleyerek, silajdaki amonyak konsantrasyonunu düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Laktik asit; silaj içerisinde oluşan diğer organik asitlerden (asetik, propiyonik ve bütirik asit) silajın pH'sını azaltmada daha etkili olduğu için, en fazla oluşması istenen organik asittir. Yapılan çalışmada silajların laktik asit değeri, Yonca +%10 Elma grubunun (8.87±1.32), kontrol grubu (4.75±0.62) ve Yonca +%5 Elma grubuna (3.78±0.26) göre önemli oranda daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Sunulan çalışmada elma ilavesinin silajların laktik asit değerini önemli derecede arttırdığı tespit edilirken, bunun sebebinin de elmanın yüksek oranda suda çözünür karbonhidrat içeriğinden dolayı silaj laktik asit değerini yükseltmesine bağlanmaktadır. Öztürk ve ark. (2006)'nın, yonca silajına ilave ettikleri mısır ve Hashemzadeh-Cigari ve ark. (2011)'nin yoncaya melas ekleyerek yaptıkları çalışmalarında, laktik asit düzeyini önemli oranda yüksek bulduklarını bildirmesi mevcut çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Bununla birlikte yonca silajının kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı katkılı ve katkısız olarak yapıldığı diğer çalışmalarda (Khadem ve ark. 2009; Kamalak ve ark. 2012; Yakışır ve Aksu 2019) laktik asit düzeylerinin sunulan çalışmadan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan yoncaların kuru madde içeriğinin sunulan çalışmadaki yoncanın kuru maddesinden yüksek oluşu, mevcut çalışmada erken vejetasyon sürecinde biçilmiş ve düşük kuru madde ile silaji yapılmış yoncanın yetersiz laktik asit oluşumuna sebebiyet verdiği kanaatine varılmıştır. Asetik asit değeri ise silaj kontrol grubu (49.73±2.21) ile %5 elma ilave edilen grupta (41.99±3.32) benzer bulunurken, %10 elma ilave edilen grupta (39.92±2.38) önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Silajda laktik asit oranının artmasıyla asetik asit miktarında azalma meydana gelmiştir. Elma katkısının asetik asit düzeyini düşürdüğü ve silajda asetik asitteki bu düşüşün, çoğunlukla silaj kullanılan ruminantların silaj tüketimini arttırabileceği yönüyle avantaj olarak değerlendirileceği bildirilmiştir (Kamalak ve ark. 2012). Diğer taraftan propiyonik asit değeri ise elma katkılı her iki grupta da (%5 Elma (5.69±0.45) ve %10 Elma (7.84±1.06)) kontrol grubuna (13.01±1.07) kıyasla önemli düzeyde düşüş olması, silaj kalitesi açısından olumlu olduğu düşünülebilir. Khadem ve ark.'nın (2009), yonca silajına ilave ettikleri arpa unu katkısının silajın PA ve AA düzeyini önemli derecede düşürdüğüne ait bildirdiği sonuçlar sunulan çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Silajların BA değerleri ise bütün gruplarda benzer olarak bulunmuştur.

Silajın Fiziksel özelliklerine göre alınan puanlar ise; Kontrol ve Yonca + %10 Elma gruplarında 5, Yonca + %5 Elma grubunda ise 6 puandır. Kalite Sınıflandırması ise "Orta" dır (Tablo 3). Buğday Samanı ile kuru madde oranı arttırılmış yonca silajının elma ilavesi ile fiziksel özelliklerinde ve kalite standartlarında herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Fleig puanına göre kalite sınıflandırmasında ise, Kontrol, Yonca + %5 Elma ve Yonca + %10 Elma gruplarında sırasıyla %23.22, %23.65 ve %23.28 olduğu tespit edilirken, elma ilavesinin yonca silajının fleig puanına etkisi olmadığı ve grupların birbirleriyle benzer olduğu belirlenmiştir. Tüm grupların kalite standartları ise fleig puanlamasında "Düşük Kalite" olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, yonca silajına %5 ve % 10 oranında suda çözünebilir karbonhidrat kaynağı olarak eklenen elmanın silajın kalitesi üzerine etkilerinin incelendiği bu araştırmada, yonca silajına katılan %10 düzeyindeki elmanın silaj kalitesini iyileştirdiği, ancak özellikle silajdaki organik asitlerin oluşumu ve dolayısıyla istenen düzeyde pH düşüşünü sağlayabilmek için, ileride yapılacak çalışmalarda kuru madde düzeyi daha yüksek yoncaya elma katılarak yapılan silajlardan daha iyi sonuçlar alınabileceği kanaatine varılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "TYL-2019-8217" nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma Doğancan ERIŞÇİ isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 01.09.2022 tarihinde Karar No: 2022/08-16 sayılı yazıyla etik izni alınmasına ihtiyaç yoktur onayı alınmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: NTB
Denetleme/Danışmanlık: NTB
Veri Toplama ve/veya İşleme: DE, AA
Analiz ve/veya Yorum: NTB, DE, AA
Makalenin Yazımı: NTB, DE, AA
Eleştirel İnceleme: DE, NTB

KAYNAKLAR

- Akyıldız R (1984).** Yemler Bilgisi Laboratuvar Kılavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 895, Uygulama Kılavuzu: 312. Ankara.
- Alçiçek A, Özkan K (1997).** Silo yemlerinde fiziksel ve kimyasal yöntemlerle silaj kalitesinin saptanması. Türkiye Birinci Silaj Kongresi, Bursa; Türkiye. 241-46.
- Ali MA, Raza H, Azam-Khan M, Hussain M (2004).** Effect of different periods of ambient storage on chemical composition of apple fruit. *Int J Agric Biol*, 6 (2), 568-571.
- AOAC (1990)** Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15, 66-88.
- Begic-Akagic A, Spaho N, Gasi F, Drkenda P, Vranac A, Meland M et al. (2014).** Sugar and organic acid profiles of the traditional and international apple cultivars for processing. *J Hyg Eng Des*, 7, 190-196.
- Besharati M, Palangi V, Nekoo N, Ayaşan T (2021)** Effects of Lactobacillus Buchneri Inoculation and Fresh Whey Addition on Alfalfa Silage Quality and Fermentation Properties. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 24 (3), 671-678.
- Campeanu G, Neata G, Darjanschi G. (2009).** Chemical composition of the fruits of several apple cultivars growth as biological crop. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*, 37 (2), 161-164.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Filya İ (2013).** Yonca silajlarında katkı maddesi olarak gladiçya meyvelerinin (Gleditsia Triacanthoso) kullanılması olanakları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (2), 291-297.

- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ (2010).** Üzüm posasının yonca silajlarında karbonhidrat kaynağı olarak kullanılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2), 269-276.
- Çiftçi M, Çerçi İH, Dalkılıç B, Güle T, Ertaş ON (2005).** Elmanın Karbonhidrat Kaynağı Olarak Yonca Silajına Katılma Olanaklarının Araştırılması. *Van Vet J*, 16 (2), 93-98.
- Daş DB, Daş A, Kirar N, Kahraman M, Budak D, Top Ş (2022).** Meyan Otunun Yonca Silajına İlavasının Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi. *MAS J App Sci*, 7 (2), 410-419.
- Doğan C (2019).** Yonca (medicago sativa L.) Silajına farklı oranlarda ilave edilen limon ve elma posalarının silaj kalitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Duru AA (2019).** Lavanta (Lavandula angustifolia) Katkısının Yonca Silajlarının Kalitesi Üzerine Etkisi. *UMAGD*, 11 (2), 426-431.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1983).** İstatistik Metotları I, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 861, Ankara.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A, Saçaklı P (2011).** Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi. Pozitif Matbaa, Ankara.
- Hashemzadeh-Cigari F, Khorvash M, Ghorbani GR, Taghizadeh A (2011).** The effect of wilting, molases and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerna silage. *S Afr J Anim Sci*, 41 (4), 377-388.
- Hecke K, Herbing K, Veberic R et al. (2006).** Sugar, acid and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 60, 1136-1140.
- Kamalak A, Özogul F, Çalışlar S, Canbolat Ö (2012).** Silaj katkı maddesi olarak tanen ekstraktının (Artutan) yonca silajının kalite özellikleri ile koyunlarda yem tüketimi sindirim derecesi ve rumen fermentasyonu üzerine etkisi. Tubitak Proje No.1100397 Kesin Rapor, TÜBİTAK, Ankara.
- Ke WC, Ding WR, Xu DM, Ding LM, Zhang P, Li FD et al (2017).** Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage. *J Dairy Sci*, 100, 8958-8966.
- Khadem AA, Sharifi M, Afzalzadeh A, Rezaeian M (2009).** Effects of diets containing alfalfa hay or barley flour mixed alfalfa silage on feeding behavior, productivity, rumen fermentation and blood metabolites in lactating cows. *Anim Sci J*, 80 (4), 403-410.
- Kılıç A (1986).** Silo Yemi Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri. İzmir, Bilgehan Basımevi.
- Kızılsimşek M, Keklik K, Günaydın T (2020).** Yeni Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Farklı Kuru Madde İçeriğine Sahip Yonca (Medicago sativa L.) Silajında Mikrobiyel İnokulant Olarak Kullanılma Olanakları *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 23 (5), 1331-1339.
- Koç F, Aksoy ÖS, Okur AA, Çelikyurt G, Korucu D, Özduven ML (2017).** Effect of Pre-Fermented Juice, Lactobacillus Plantarum and Lactobacillus Buchneri on the Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of High Dry Matter Alfalfa Bale Silage. *J Anim Plant Sci*, 27 (6), 1766-1773.
- Kurtoğlu V (2008).** Silaj ve Silaj Katkı Maddeleri. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Ders Notu, Konya.
- Lee CY (2012).** Common nutrients nutritive quality of apples. *NYFQ*, 20 (3), 3-7.
- Leventini MW, Hunt C, Roffler RE, Casebolt DG (1990).** Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. *J Anim Sci*, 68, 4334-44.
- Mut H, Gülümser E, Çopur M, Doğrusöz MÇ, Başaran U (2020).** Değişik Arkadaş Bitkilerin Yonca Silaj Kalitesine Etkisi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 23 (4), 975-980.
- Orak A ve Gökkaya G (2014).** Yonca Tarımı. İlgi Matbaacılık, Ankara.
- SPSS (2006).** IBM SPSS statistics version 13.0 for Windows. New York, International Business Machines Corporation.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis D (1991).** Methods of dietary fiber neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 7, 3583-3597.
- Yakışır BÖ, Aksu T (2019).** Farklı Seviyelerde Melaslı Kuru Şeker Pancarı Posası İlavasının Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi. *Van Vet J*, 30 (2), 71-76.



Yara İyileşmesinde Centella Asiatica Ekstraktı, Çinko Oksit ve Alaptidum İçeren Merhemlerin Etkinliğinin Klinik ve Histopatolojik Olarak Karşılaştırılması

Murat KORKMAZ¹, Tunahan SANCAK²*

¹ Van Yuzuncu Yil University, Health Sciences Institute, Department of Veterinary Surgery, 65040, Van, Turkey

² Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Surgery, 58070, Sivas, Turkey

Received: 12.10.2022

Accepted: 22.11.2022

ÖZ

Yara, canlı dokunun anatomik ve fiziksel bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak; dokunun mevcut fizyolojik faaliyetlerinin tamamının veya bir kısmının ortadan kalktığı durum olarak tanımlanabilir. Günümüzde yara iyileşmesini hızlandırmak ve süreci kısaltmak adına farklı birçok tedavi protokolü güncel yara tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Gelişen teknoloji ve tıp alanındaki gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan medikal ürünler tedavinin seyrinide etkilemiştir. Bu çalışmada Winstar albino ratlarda oluşturulan kesik yaralarında, *C. asiatica* ekstraktı, çinko oksit ve alaptidum içeren merhemlerin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 36 adet winstar ırkı rat rastgele önce onikişerli daha sonra bu gruplar kendi aralarında altışarlı gruplara ayrılmıştır. Oluşturulan çalışma grupları 5. ve 10. gün olmak üzere gruplandırılmıştır. Gruplara genel anestezi altında tıraş ve dezenfeksiyonun ardından sırtın sağ ve sol bölgesine tüm katları içerecek şekilde 2 adet kesik yarası oluşturulmuş ve bu yaralara sabah akşam olmak üzere merhemler uygulanmıştır. 5. ve 10. gün sonunda kurban edilmiş ratlardan alınan örnekler laboratuvara histopatolojik inceleme için gönderilmiştir. Yapılan çalışma sonunda alaptidum ve çinko oksit içeren merhemlerin uygulandığı gruplarda epitelyal rejenerasyonun daha erken tamamlandığı ve dermiste fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun daha erken olgunlaştığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Alaptidum, Centella asiatica, Çinko oksit, Yara iyileşmesi.

ABSTRACT

Clinical and Histopathological Comparison of the Efficacy of Ointments Containing Centella Asiatica extract, Zinc Oxide and Alaptidum in Wound Healing

Wound, depending on the deterioration of the anatomical and physical integrity of living tissue; It can be defined as the situation in which all or some of the existing physiological activities of the tissue disappear. Today, many different treatment protocols are frequently used in current wound treatments in order to accelerate wound healing and shorten the process. Medical products that emerged depending on the developing technology and developments in the field of medicine also affected the course of treatment. In this study, it was aimed to histopathologically examine the effects of ointments containing *C. asiatica* extract, zinc oxide and alaptidum on wound healing in cut wounds in Winstar albino rats. For this purpose, 36 winstar albino rats were randomly divided into groups of twelve and then six groups among themselves. The created study groups were grouped as 5th and 10th days. After shaving and disinfection under general anesthesia, 2 cut wounds were created in the right and left areas of the back, including all layers, and ointments were applied to these wounds' morning and evening. At the end of the 5th and 10th days, the samples taken from the sacrificed rats were sent to the laboratory for histopathological examination. At the end of the study, it was observed that epithelial regeneration was completed earlier and fibrovascular connective tissue proliferation matured earlier in the groups in which ointments containing alaptidum and zinc oxide were applied.

Keywords: Alaptidum, Centella asiatica, Wound healing, Zinc oxide.

GİRİŞ

Yara deri, müköz membranlar ve organlarda fiziksel, kimyasal, radyasyon, termal, cerrahi müdahale veya patolojik olarak dokuların (deri, deri altı dokular, kaslar, tendonlar, sinirler, damarlar ve hatta kemik) bütünlüğünün bozulmasıdır (Uyar ve ark. 2017; Negut ve

ark. 2018; Dai ve ark. 2020; Herman ve Bordoni 2022). Yara çeşitli nedenlerle meydana gelebilir. Bunlar, fiziksel ve kimyasal yanma, hayvan ısırığı ya da sokması, çeşitli metabolik bozukluklar, travma, ilaç etkileşimleri, ya da beslenmedeki yetersizlikler sonucunda meydana gelebilir (Özkorkmaz ve Özay 2009; Negut ve ark. 2018). En çok karşılaşılan yara semptomlarına bakacak olursak yaranın



lokalize olduğu bölgede fiziksel hasarlar, kanama, duyu ve fonksiyon kaybı, yara çevresinde kızarıklık, acı zonklama hissi, bölgedeki dokularda büzüşme ve akıntı dikkat çeker. Yaralar kısmi ve tam kalınlıktaki yaralar gibi sınıflandırılabilirken yine akut ve kronik yaralar, açık ve kapalı yaralar olarak da sınıflandırılabilir. Özellikle kronik yaralar şekillendikleri bölge ve sürecin uzunluğuna bağlı olarak hastanın yaşam kalitesini etkilerler (Özkorkmaz ve Özyay 2009; Fossum 2013; Özel 2018). Yaraların iyileşmesi için belirli bir süre verilemediği gibi makul süreler içinde iyileşmeyen yaralar için kronik yara ifadesi kullanılır. Diyabet, periferik damar hastalıklarının artmasıyla birlikte derinin total bütünlüğünü bozan akut ve kronik yaraların görülme sıklığı da artmıştır (Kuzay 2019; Mutlu ve Yılmaz 2019). Yara sağaltımında yaraya yaklaşım yaranın niteliğine bağlı olarak değişmektedir. Yara sağaltımında komplikasyonun en az ve iyileşme sürecinin en hızlı olduğu seçenekler üzerinde durulmalı ve iyileşme süreci olabildiğince kısaltılmalıdır (Rızalar ve ark. 2019). Yara iyileşmesi sürecinde yaranın lokalize olduğu bölge, canlılığın türü ve yaranın kontaminasyon derecesi göz önünde bulundurularak uygun sağaltım seçenekleri değerlendirilmelidir. Bütün yaralar aynı prensiple iyileşmekle birlikte bütün sistemleri içeren hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar bütünüdür (Parsak ve ark. 2007). Yara iyileşmesi temelde 4 safhada gerçekleşir bunlar sırasıyla; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve epitelizeasyon ile maturasyon ve remodeling evresidir (Kuranel 2012).

Sonuç olarak bu çalışmada; Winstar albino ratlarda oluşturulan kesik yaralarında çinko oksit ve alaptidum içeren merhemlerin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histopatolojik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30/09/2021 tarih ve 2021/09-13 sayılı karar ile izin alınarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü'nde yapılmıştır.

Hayvan Materyali

Çalışmada her biri ortalama 250 gr ağırlığında 36 adet Wistar cinsi albino erkek rat kullanılmıştır. Ratlara yaralar oluşturulmadan önce genel anestezi sağlamak amacıyla 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Basilazin® %2, 50 ml, Bavet) ile 80 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketasol®, İnterhas) (Erman 2021) aynı enjektöre çekilerek, birlikte intraperitoneal olarak uygulanmıştır (Smith 1993).

Kesik Yarasının Oluşturulması

Anesteziye alınan çalışma ve kontrol grubundaki 36 adet Wistar cinsi albino rat denemelerden önce bölgenin tıraş ve dezenfeksiyonun yapılmasının ardından rastgele 3 ayrı gruba ayrılmıştır. Tıraş ve dezenfeksiyon işleminin tamamlanmasına müteakip ratların sırt bölgesinin bir adet sağına ve bir adet soluna 1 cm büyüklüğünde olacak şekilde tam katlı deri ensizyonu gerçekleştirilerek iki adet kesik yarası oluşturuldu.

İlaç Materyali

Bu çalışmada 3 farklı ticari ilaç kullanılmıştır. Kullanılan ilaçlar Centella asiatica ekstraktı (Madecassol® %1, 40 gr, Bayer), çinko oksit (Sudocrem®, 60gr, Teva) ve alaptidumdur (Alaptid®, 20gr, Bioveta).

Hayvan Deneyleri

Çalışmada kullanılan 36 adet Winstar ırkı ratın sırtlarına iki adet tam kat deri ensizyonu oluşturulduktan sonra

rastgele 3 gruba ayrılmıştır. Oluşturulan bu gruplar ise kendi içinde 2 gruba ayrılarak toplamda 6 adet grup oluşturulmuştur. Sol taraftaki yara bölgesine 1. gruptaki ratlara *C. asiatica* ekstraktı, 2. gruptaki ratlara çinko oksit ve 3. gruptakilere alaptidum içeren merhemler uygulanmıştır. Ayrıca tüm gruplarda sağ taraftaki yara bölgesi ise kontrol yarası olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Ratın sırt kısımlarına oluşturulan yaralar.

Figure 1: Wounds on the back of the rat.

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 de bulunan ratların sağ tarafındaki yaralar kontrol yarası olarak kalmış ve yara üzerine sadece izotonik solüsyon uygulanmıştır. Sol taraflarındaki yaraya ise 10 gün boyunca grup 1'e *C. asiatica* ekstraktı, grup 2'ye çinko oksit ve grup 3'e alaptidum içeren merhemler sabah akşam olacak şekilde günde toplamda 2 kere uygulanmıştır. Erken ve geç dönem yara iyileşmesinin izlenmesi için (Falcioğlu 2017; Hancıoğlu 2018) 12'şer rattan oluşan bu 3 grupta 5. günde 6 rat, 10. günde ise kalan 6 rat kurban edilmiştir.

Histopatolojik İnceleme İçin Örnek Alınması

Toplamda 36 adet rat çalışma sırasında 3 farklı gruba ayrıldı her grupta kendi içinde 6'şarlı iki gruba ayrılmıştır. 1. gruptaki 6 rat, 2. gruptaki 6 rat ve 3. gruptaki 6 rat 5. gün sonunda kurban edilmiştir. Kontrol grubunu 1. 2. ve 3. gruplardan rastgele her gruptan 2 adet olmak üzere alınan örnekler oluşturmuştur. Geriye kalan 18 rat yine aynı şekilde 10. gün sonunda kurban edilmiştir. Deneklerden örnekler, yara bölgesinden ve lezyonsuz çevre dokudan yaklaşık 0,5 cm kadar kalınlığı içerecek şekilde alınarak ve patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Laboratuvara gönderilen örnekler %10' luk tamponlu formaldehit solusyonunda 72 saat fikse edilmiştir. Rutin takip işlemi kapsamında; doku örnekleri alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyonları, ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflandırılmaları sağlanmış ve daha sonrasında parafinde bloklanmıştır. Bu bloklardan mikrotomda (Leica RM 2135) 4µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilin-Eozin (H&E) boyama tekniğine göre boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

BULGULAR

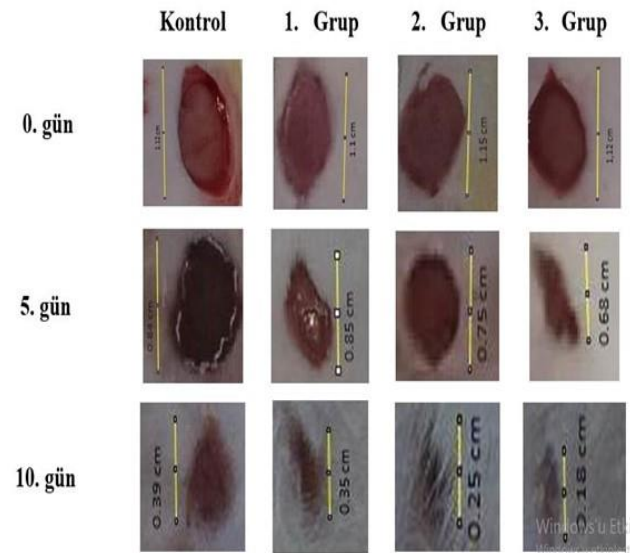
Morfolojik Bulgular

Çalışma boyunca alınan fotoğraflarda Image J2 programı kullanılarak yara ölçümleri yapılmıştır. Yapılan bu ölçümler sonucunda oluşan değerler Şekil 2'de verilmiştir. Çalışmanın 5. ve 10. gününde yapılan makroskobik incelemelerde kontrol grubuna ait ratların yara bölgelerinde diğer tedavi gruplarına göre kısmen düzensiz bir kabuklanma gözlenmiştir. 1. grupta yaralarda kabuklanma daha az fakat yara bölgesinde seröz sıvı mevcuttur. 2. grup ve 3. grupta ise kabuklanma daha düzenli bir görünüme sahiptir. 10. günde kontrol grubunda yara iyileşmesinin büyük oranda tamamlanmadığı görülürken, 1. grup, 2. grup ve 3. gruplarda yara izlerinin kısmen kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1: 5. ve 10. gün nekropsi yapılan ratların yara bölgelerinde rejenerasyonla ilgili saptanan histopatolojik değişikliklerin skorlanması.

Table 1: Scoring the histopathological changes related to regeneration in the wound areas of rats necropsied on the 5th and 10th days.

| Histopatolojik değişiklikler | Histopatolojik değişikliklerin derecesi | 5. gün | | | | 10. gün | | | |
|---------------------------------------|---|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | | Kontrol | 1.grup | 2.grup | 3.grup | Kontrol | 1.grup | 2.grup | 3.grup |
| Epitelyal rejenerasyon | * | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 |
| | ** | 4 | 4 | 3 | 3 | 0 | 5 | - | 1 |
| | *** | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| | | - | - | 1 | - | 5 | - | 5 | 3 |
| Fibrovasküler Bağ Doku Proliferasyonu | * | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 |
| | ** | - | 4 | 2 | 3 | 6 | 6 | 1 | - |
| | *** | 6 | 2 | 3 | 3 | - | 0 | 3 | 5 |
| | | - | - | 1 | - | - | - | 2 | 1 |
| Akut İnflamasyon | * | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 4/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 |
| | ** | 2 | 4 | 3 | 3 | 1 | - | 5 | 4 |
| | *** | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 6 | 1 | 2 |
| | | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |



Şekil 2. Gruplar arası morfolojik değişiklikler.

Figure 2. Morphological changes in between groups.

Histopatolojik Bulgular

Parafin bloklardan Rotary mikrotomla 4-5 µm'lik kesitler alınmasının ardından, kesitler hematoxilen-eozin (HE) yöntemiyle boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Nikon 80i, DS-R12; Nikon, Japan). Kesitler histopatolojik olarak; epitelyal rejenerasyon, akut inflamasyon, anjiyogenezis (vaskülarizasyon) ve fibrozis (fibrovasküler bağ doku proliferasyonu) bakımından değerlendirilmiştir. Saptanan histopatolojik değişikliklerin derecesi; hafif (*), orta (**), ve belirgin (***) şeklinde skorlanmış ve Tablo 1'de verilmiştir.

5. Gün Histopatolojik Bulgular

Kontrol Grubu

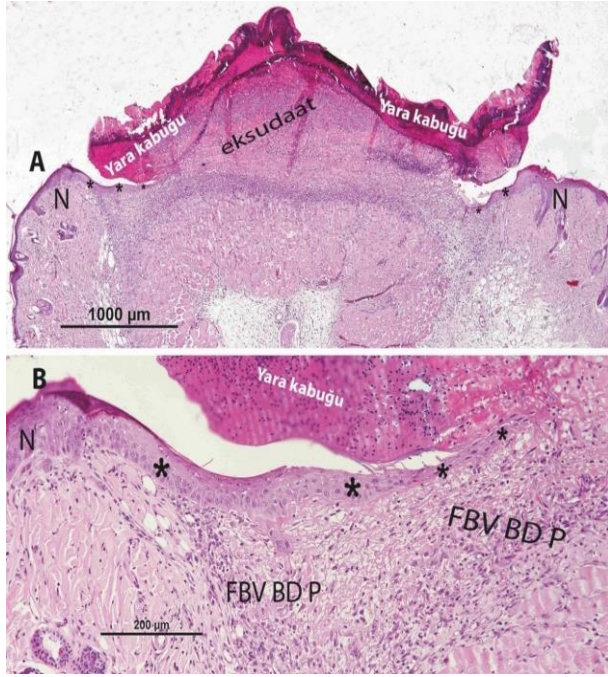
Kontrol grubunda; (A) derinin yara oluşturulan bölgelerinde (N harfleri arasındaki alanda); kısmi bir epitelyal rejenerasyon (*) saptanmıştır. * işaretli bölgenin daha büyük görüntülemesinde; (B) normal (N) bölgenin hemen sağında epitelyal rejenerasyonun yara kabuğu altından ilerlediği ve çok kısa bir alanda izlenebildiği (*), ileriki bölgelerde üstte yara kabuğu altta purulent bir eksudat, daha alt kısımlarda ise fibrovasküler bağ doku proliferasyonu (FBV BD P) gözlenmiştir (Şekil 3A-B).

1. Grup

1. grupta; (A) derinin yara oluşturulan bölgelerinde (N harfleri arasındaki alanda); kısmi bir epitelyal rejenerasyon (*) saptanmıştır. * işaretli bölgenin daha büyük görüntülemesinde; (B) normal (N) bölgenin hemen sağında epitelyal rejenerasyonun purulent eksudat- yara kabuğu altından ilerlediği ve çok kısa bir alanda izlenebildiği (*), ileriki bölgelerde üstte yara kabuğu altta purulent bir eksudat, daha alt kısımlarda ise fibrovasküler bağ doku proliferasyonu (FBV BD P) gözlenmiştir (Şekil 4A-B).

2. Grup

Derinin yara oluşturulan bölgelerinde (N harflerinin solundaki alanda); çok kısmi bir epitelyal rejenerasyon (ok) saptanmıştır. Epitelyal rejenerasyonun yara kabuğu-purulent eksudat altından ilerlediği ve ancak çok kısa bir alanda izlenebildiği (ok), ileriki bölgelerde üstte yara kabuğu altta purulent bir eksudat, daha alt kısımlarda ise fibrovasküler bağ doku proliferasyonu (FBV BD PR) gözlenmiştir. Diğer bir olguda (B) derinin yara oluşturulan bölgelerinde (N harflerinin sağındaki alanda); belirgin bir epitelyal rejenerasyon (*) saptanmıştır. Epitelyal rejenerasyonun başlangıç bölgelerinde keratinizasyonun (oklar) da olduğu dikkati çekmiştir. Dermiste ise anjiyogenezisten zengin belirgin fibrovasküler bağ doku proliferasyonu (FBV BD P) gözlenmiştir (Şekil 5A-B).



Şekil 3: A. Kontrol grubunun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (1000 µm), N: normal deri bölgesi, *: kısmi epitel rejenerasyon, B. Kontrol grubunun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), N: normal deri bölgesi, *: kısmi epitel rejenerasyon, FBV BD P: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu

Figure 3: A. Histopathological findings of the control group on the 5th day (H&E) (1000 µm), N: normal skin area, *: partial epithelial regeneration. B. Histopathological findings of the control group on the 5th day (H&E) (200 µm), N: normal skin area, *: partial epithelial regeneration, FBV BD P: fibrovascular connective tissue proliferation.

3. grup

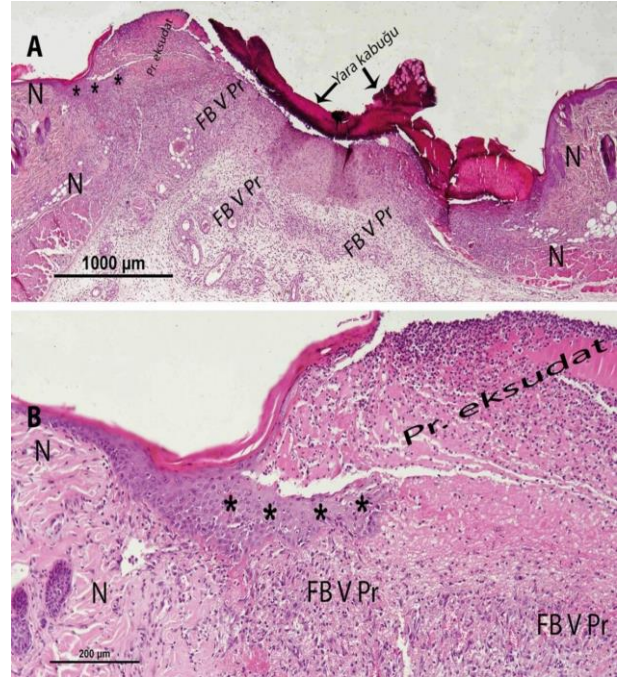
3. grupta; (A) derinin yara oluşturulan bölgelerinde (N harfleri arasındaki alanda); belirgin bir epitelyal rejenerasyon saptanmamıştır. Kalın oklar arasındaki bölgenin daha büyük görüntülemesinde; (B) normal (N) bölgenin hemen sağında epitelyal rejenerasyonun henüz yeni başladığı ve çok kısa bir alanda izlenebildiği (ince oklar arası), ileriki bölgelerde üstte purulent bir eksudat (*), daha alt kısımlarda ise fibrovasküler bağ doku proliferasyonu (FBV BD P) gözlenmiştir (Şekil 6A-B).

Sonuç olarak denemenin 5. gününde kesilen ratlarda çoğunlukla benzer bulgular saptanmış olup epitelyal rejenerasyonun çok zayıf olduğu, ancak 2. grupta bir ratta epitelyal rejenerasyonun ve fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun oldukça belirgin olduğu dikkati çekmiştir. Bu grupların hemen hepsinde en üstte değişen miktarlarda nekrotik eksudattan oluşan bir yara kabuğu vardır. Hemen altında da makrofaj, mikrofaj, eritrosit ve plazmatik bir kitleden oluşan eksudat görülmüştür. Daha alt kısımlarda (dermiste) ise yeni damar (anjyogenezis) oluşumlarından zengin aktif ve gevşek bağ doku proliferasyonu izlenmiştir (Şekil 3, 4, 5, 6).

10. Gün Histopatolojik Bulgular

Kontrol Grubu

Kontrol grubunda; bir olgu dışında epidermiste epitelyal rejenerasyon (*) tamamlandığı, dermiste fibrovasküler bağ doku (FBV BD PR) proliferasyonunun (fibrozis) olgunlaştığı, kollajence zenginleştiği ve hücrel infiltrasyonların azaldığı saptanmıştır (Şekil 7A-B).



Şekil 4: A. 1. grubun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (1000 µm), N: normal deri bölgesi, *: kısmi epitel rejenerasyon, FB V Pr: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu, B. Kontrol grubunun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), N: normal deri bölgesi, *: kısmi epitel rejenerasyon, FBV BD P: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

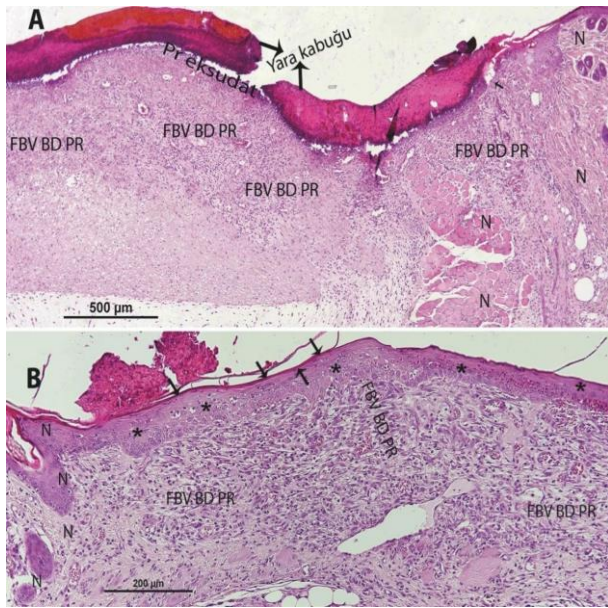
Figure 4: A. Histopathological findings of the 1st group on the 5th day H&E] (1000 µm), N: normal skin area, *: partial epithelial regeneration. B. Histopathological findings of the control group on the 5th day (H&E) (200 µm), N: normal skin area, *: partial epithelial regeneration, FBV BD P: fibrovascular connective tissue proliferation.

1. Grup

Sadece 1 olguda epidermiste epitelyal rejenerasyonun (*) tamamlandığı, ancak bu olguda rejener epitel katmanının da daha az sayıda epitel hücresinden oluştuğu, ayrıca epitelyal rejenerasyonun (*) henüz tamamlanmadığı (oklar) olgularda daha belirgin olmak üzere, dermiste fibrovasküler bağ doku (FBV BD PR) proliferasyonunun henüz tam olgunlaşmadığı (fibrozis yetersiz) yani daha aktif bir bağ doku görünümünde olduğu ve hücrel infiltrasyonların devam ettiği saptanmıştır (Şekil 8A-B).

2. Grup

Bu grupta, bütün olgularda epidermiste epitelyal rejenerasyon (*) tamamlandığı, dermiste fibrovasküler bağ doku (FBV BD PR) proliferasyonunun çoğunlukla olgunlaştığı (fibrozis), kollajence zenginleştiği ve hücrel infiltrasyonların azaldığı saptanmıştır. Ayrıca epitelyal rejenerasyonunun tamamlandığı bölgelerde bazı olgularda aynı zamanda rejener epitelin yer yer dermise doğru papiller uzantılar (oklar) da oluşturduğu, stratum korneum ve stratum bazale (germinativ hücrelerinin de) tabakalarının da rejener olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 9A-B).



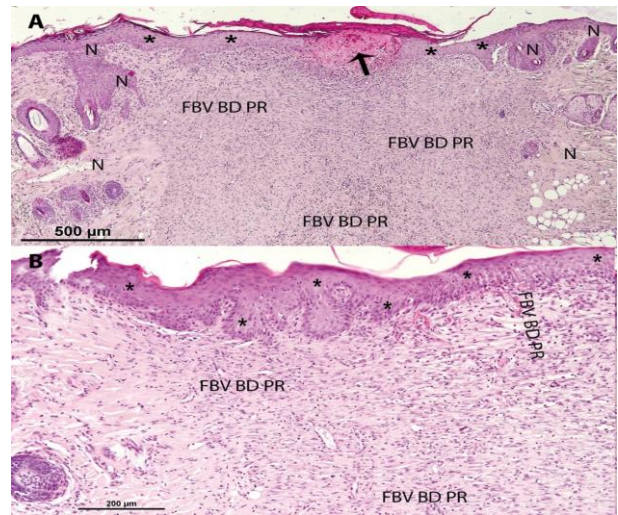
Şekil 5: A. 2. grubun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), N: normal deri bölgesi, →: purulent eksüdat, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu, B. 2. grubunun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, →: keratinizasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 5: A. Histopathological findings of group 2 on day 5 (H&E) (500 µm), N: normal skin area, →: purulent exudate, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation, B. Histopathological findings of group 2 on day 5 (H&E) (200 µm), N: normal skin area, *: epithelial regeneration, →: keratinization, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation.



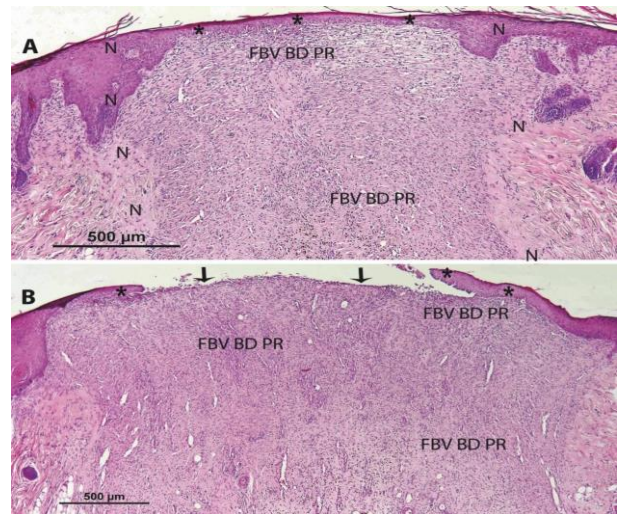
Şekil 6: A. 3. grubun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (1000 µm), N: normal deri bölgesi, →: epitel rejenerasyon, *: purulent eksüdat, B. 3. grubunun 5. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), N: normal deri bölgesi, *: purulent eksüdat, →: epitel rejenerasyon, FBVD: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 6: A. Histopathological findings of group 3 on day 5 (H&E) (1000 µm), N: normal skin area, →: epithelial regeneration, *: purulent exudate, B. Histopathological findings (H&E) on day 5 of group 3 (200 µm), N: normal skin area, *: purulent exudate, →: epithelial regeneration, FBVD: fibrovascular connective tissue proliferation.



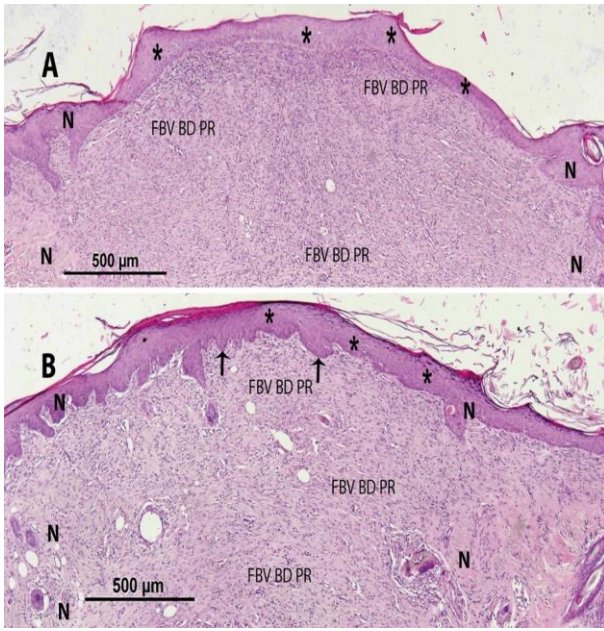
Şekil 7: A. Kontrol grubun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku, B. Kontrol grubunun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 7: A. Histopathological findings (H&E) (500 µm) of the control group on the 10th day, N: normal skin area, *: epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue, B. Histopathological findings (H&E) of the control group on the 10th day (200 µm), N: normal skin area, *: epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation.



Şekil 8: A. 1. grubun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku, B. 1. grubunun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), *: epitel rejenerasyon, →: yetersiz epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 8: A. Histopathological findings on day 10 of group 1 (H&E) (500 µm), N: normal skin area, *: epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue, B. Histopathological findings of group 1 on day 10 (H&E) (500 µm), *: epithelial regeneration, →: insufficient epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation.



Şekil 9: A. 2. grubun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku, B. 2. grubunun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), *: epitel rejenerasyon, →: papil, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 9: A. Histopathological findings of group 2 on day 10 (H&E) (500 µm), N: normal skin area, *: epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue, B. Histopathological findings on day 10 of group 2 (H&E) (500 µm), *: epithelial regeneration, →: papilla, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation.

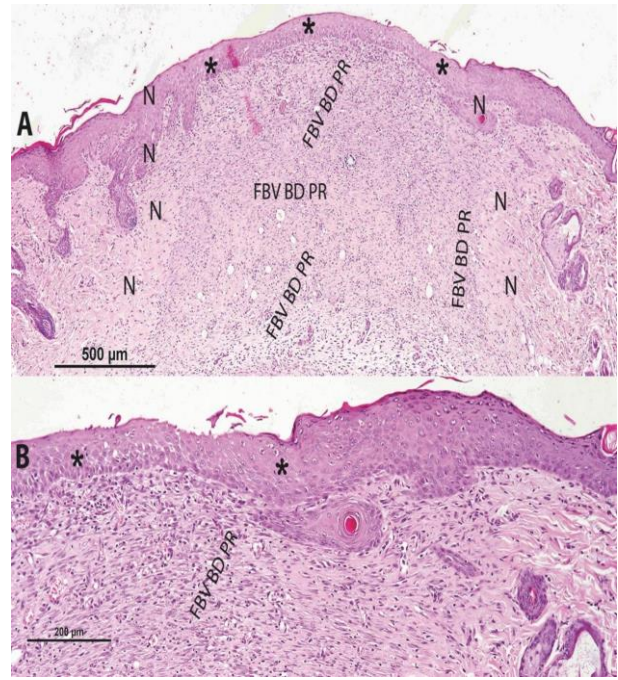
3. Grup

Bu grupta bütün olgularda epidermiste epitelyal rejenerasyonun (*) tamamlandığı, dermiste fibrovasküler bağ doku (FBV BD PR) proliferasyonunun (fibrozis) olgunlaştığı, kollajence zenginleştiği ve hücrel infiltrasyonların azaldığı saptanmıştır (Şekil 10A-B).

Sonuç olarak çalışmanın 10. gününde kesilen ratlarda gruplar arasında benzer bulgular gözlenmekle birlikte; 3. grup ve özellikle de 2. grupta epitelyal rejenerasyonun diğer gruplara göre daha güçlü bir şekilde gerçekleştiği, fibrozisin kollajence zengin olduğu ve hücrel infiltrasyonların da daha az bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca rejener epitel tabakanın daha çok hücreden oluştuğu, rejener epitelin dermise doğru papiller uzantılar oluşturduğu ve tek sıralı germinativ hücrelerinin de rejener olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 7, 8, 9, 10). Sonuçta 2. ve 3. gruplarda epitelyal rejenerasyonun daha erken tamamlandığı ve dermiste fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun daha erken olgunlaştığı söylenebilir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yara tedavisi, tıp tarihinin başlangıcından beri araştırmacıların temel ilgi alanı olmuştur. Son yıllarda gelişen tıp ve teknolojiye bağlı olarak ortaya çıkan modern yara örtüleri ve merhemler tedavilerin seyrini olumlu yönde etkilemiştir. Yara tedavilerinde kullanılan değişik içerik ve muhteviyata sahip merhemler ve tıpta sıkça kullanılan geleneksel bitkiler hakkında literatüre bakıldığında konuyla alakalı birçok çalışmanın olduğu görülmüştür (Kurtoğlu ve Karataş 2009; Fossum 2013; Karasu ve Bakır, 2016; Li ve ark. 2020; Bao ve ark. 2022; Jin ve ark. 2022; Zeng ve ark. 2022).



Şekil 10: A. 3. grubun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (500 µm), N: normal deri bölgesi, *: epitel rejenerasyon, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku, B. 3. grubunun 10. gün histopatolojik bulguları (H&E) (200 µm), *: epitel rejenerasyon, →: papil, FBV BD PR: fibrovasküler bağ doku proliferasyonu.

Figure 10: A. Histopathological findings of group 3 on day 10 (H&E) (500 µm), N: normal skin area, *: epithelial regeneration, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue, B. Histopathological findings on day 10 of group 3 (H&E) (200 µm), *: epithelial regeneration, →: papilla, FBV BD PR: fibrovascular connective tissue proliferation.

Erman (2021) yaptığı çalışmada magnezyum sülfat içeren krem formundaki topikal ajanların yara iyileşmesi üzerine kontrol grubuna göre 7. günde daha fazla anjiyogenezis şekillendirdiği görülmüştür. Han ve ark. (2017) yaptığı çalışmada da *Nigella sativa* ve *Hypericum perforatum* uygulanan yaralarda kontrol grubuna göre 7. günde anjiyogenezin daha zengin olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmada da Erman (2021) ve Han ve ark. (2017) nin yaptığı çalışmalara benzer olarak erken dönemde çinko oksit ve alaptidum içeren kremlerinin yara bölgesinde anjiyogenezisi kontrol grubuna göre daha da artırdığını görülmüştür. Çalışmanın bu sonuçları diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Altan ve ark. (2015) yılında yaptıkları çalışmada Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*) bitkisinin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bitkinin yapısında ihtiva ettiği amentoflavon, hiperforin ve hiperisin gibi maddeler bitkiye antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral birtakım özellikler kazandığı ve yapılan bu çalışmada *Hypericum perforatum* bitkisinin enflamasyon periyodunu kısalttığı aynı zamanda fibroblast göçünü hızlandırdığı, kollajen depolanmasını artırdığı ve daha iyi epitelizeasyona neden olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında 10. günde çinko oksit ve alaptidum içeren kremlerinin uygulandığı gruplarda kontrol ve *C. asiatica* ihtiva eden merhemlerin uygulandığı gruplara göre daha erken bir epitel rejenerasyonun şekillendiği ve dermiste fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun daha erken olgunlaştığı gözlenmiştir. Yapılan bu tez çalışmasındaki sonuçların, Altan ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla benzer etkileri olduğu görülmektedir.

Güngör (2013) yara iyileşmesinde sık kullanılan vişne çekirdeği yağı, çörek otu yağı ve toros göknarı reçinesinin yara iyileşmesi üzerine etkisini incelemiştir. Yara iyileşmesinde biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için altı sarı şam, kontrol, vişne çekirdeği yağı, çörek otu yağı ve toros göknarı reçinesi rat grupları oluşturulmuştur. Bu gruplarda tam kat yara modeli oluşturularak 7. ve 14. günde alınan dokularda oksidatif stres ve eser element (Zn, Cu, Se) parametreleri değerlendirilmiştir. Histopatolojik inceleme de ise, akut ve kronik inflamasyon, damar proliferasyonu, yüzeyin kapanması, epitelizasyon, fibroblast aktivite artışı ve kollejen kabaşma parametreleri yönünden incelenmiş ve biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler sonunda şam ve kontrol grupları ile tedavi grupları kıyaslandığında anlamlı farklılık bulunduğu yapılan değerlendirme sonucunda vişne çekirdeği yağı ve çörek otu yağı grubunda iyileşme süreleri daha erken olup, mikroskopik değerlendirme sonucu da rejenerasyon oluşumu açısından belirgin farklılık gözlenmiştir.

Çalışmada 5. gün sonrası alınan örneklerde kontrol, çinko oksit alaptidum ve *C. asiatica* ekstrati ihtiva eden merhem uygulandığı grubun histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonrası; gruplar arasında çoğunlukla benzer bulgular olduğu, epitelyal rejenerasyonun çok zayıf olduğu, ancak çinko oksit ihtiva eden merhem uygulandığı gruplarda bir ratta epitelyal rejenerasyonun ve fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun oldukça belirgin olduğu dikkati çekmektedir. Bu grupların hemen hepsinde en üstte değişen miktarlarda nekrotik eksudattan oluşan bir yara kabuğu tespit edilmiştir. Hemen altında da makrofaj, mikrofaj, eritrosit ve plazmatik bir kitleden oluşan eksudat görülmüştür. Daha alt kısımlarda (dermiste) ise yeni kapillar damar (anjyogenezis) oluşumlarından zengin aktif ve gevşek bağ doku proliferasyonu izlenmiştir.

Çalışmanın 10. günü sonrası alınan örneklerde ise, gruplar arasında benzer bulgular gözlenmekle birlikte; alaptidum ve özellikle de çinko oksitin uygulandığı gruplarda epitelyal rejenerasyonun diğer gruplara göre daha güçlü bir şekilde gerçekleştiği, fibrozisin kollajence zengin olduğu ve hücrel infiltrasyonların da daha az bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca rejener epitel tabakanın daha çok hücreden oluştuğu, rejener epitelin dermise doğru papiller uzantılar oluşturduğu ve tek sıralı germinatif hücrelerinin de rejener olduğu dikkati çekmektedir.

Şındak ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada Japon Bildircinlarında (*Coturnix Coturnix Japonica*) yara iyileşmesinde topikal olarak menengiç yağı ile farklı deneysel karışımların etkileri karşılaştırılmıştır. Buna göre 10. günde alınan örneklerde menengiç yağı ve *C. asiatica* ekstrati karışımı uygulanan ratlarda bağ doku artışının menengiç yağı ve rifamisin karışımı uygulanan ratlara göre daha belirgin olduğu; menengiç, menengiç yağı ve *C. asiatica* ekstrati karışımı ile menengiç yağı ve rifamisin karışımı uygulanan gruplarda da epitelizasyonun başladığı görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında 10. günde alınan örneklerde çinko oksit ve alaptidum uygulanan ratlarda epitelizasyonun güçlü olduğu kontrol grubu ve *C. asiatica* ekstrati uygulanan grupta ise Şındak ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada olduğu gibi epitelizasyonun zayıf olduğu belirlenmiştir.

Falcıoğlu (2017)'nin yaptığı çalışmada tam kat deri yarası oluşturulmuş ve bu yaralara trombosit zengin membran uygulaması yapılmıştır. 10. günde alınan yara örneklerinin histopatolojik incelenmesinde de epitelizasyon gözlenmiştir. Sunulan bu tez çalışmasında

çinko oksit ve alaptidum merhemlerinin uygulandığı ratlarda epitelizasyonun, 10. günde Falcıoğlu (2017)'nin çalışmasındaki sonuçlarla benzer çıktığı görülmüştür.

Hancıoğlu (2018)'nin ratlarda kesi yarasında ankaferd blood stopper ampul uygulamasının yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin incelenmesinde 10. günde histopatolojik bulgularda fibrozisi belirgin olarak artırdığı görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında da çinko oksit ve alaptidum merhemlerinin uygulandığı ratlarda Hancıoğlu (2018)'nin bulduğu sonuçlarla benzer sonuçlar bulunmuştur.

Sonuç olarak 5. ve 10. gün sonunda alınan örneklere bakılarak yapılan histopatolojik değerlendirmede; 2. grup ve 3. gruptaki ratlarda epitelyal rejenerasyonun daha erken tamamlandığı ve dermiste fibrovasküler bağ doku proliferasyonunun daha erken olgunlaştığı görülmüştür. Çinko oksit ihtiva eden merhem uygulandığı ratlarda (2. grup) morfolojik olarak yaralardaki kapanma alaptidum içeren merhem kullanılan ratlardaki (3. grup) yaraların kapanma oranına benzer sonuçlar vermiştir. *C. asiatica* ekstrati ihtiva eden merhem uygulandığı ratlarda ve kontrol grubundaki ratlarda ise morfolojik olarak yaraların kapanma oranı benzer olup çinko oksit ve alaptidum içeren merhemlerin uygulandığı gruplara göre yetersiz olduğu gözlemlenmiştir.

Alaptidumun tüm sıcakkanlı gıda dışı hayvanlarında kullanılıyorken çinko oksitin beşerî olarak dahi kullanılıyor olması, daha ulaşılabilir bir ürün olduğunu göstermektedir. Ayrıca her ne kadar morfolojik olarak alaptidum ihtiva eden merhem diğer merhemlere göre daha iyi sonuçlar gösterece, histopatolojik olarak çinko oksit ihtiva eden merhem yara iyileşmesinde kullanılan diğer merhemlerden epitel rejenerasyon ve fibrovasküler bağ doku proliferasyonu açısından daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Çalışmanın histopatoloji çalışmalarını yapan Prof. Dr. Zabit YENER'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KELEŞ'e, çalışmaya destek sağlayan ve çalışmanın hazırlıklarında yardımda bulunan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi çalışanlarına teşekkür ederiz.

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "TYL-2022-9813" nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma Murat KORKMAZ isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30/09/2021 tarih ve 2021/09-13 sayılı karar ile izin alınarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü'nde yapılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MK, TS

Denetleme/Danışmanlık: MK, TS

Veri Toplama ve/veya İşleme: MK, TS

Analiz ve/veya Yorum: MK, TS

Makalenin Yazımı: MK, TS

Eleştirel İnceleme: MK, TS

KAYNAKLAR

- Altan A, Damlar İ, Aras M, Alpaslan C (2015).** Effect of St. John's Wort (*Hypericum Perforatum*) On Wound Healing. *AKTD*, 24 (4), 578-591.
- Bao L, Cai X, Zhang M ve ark. (2022).** Bovine collagen oligopeptides accelerate wound healing by promoting fibroblast migration via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J Funct Foods*, 90, 1-9.
- Dai C, Shih S, Khachemoune (2020).** Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *J Dermatolog Treat*, 31 (6), 639-648.
- Erman MM (2021).** Magnezyum Sülfat İçeren Krem Formundaki Topikal Ajanların Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Rat Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Falcoğlu Ç (2017).** Tam Kat Cilt Defektlerinde Trombositten Zengin Fibrin Membran Kullanımının Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye.
- Fossum TW (2013).** Small Animal Surgery Textbook. 4th Edition. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Güngör M (2013).** Ratlarda Vişne (*Prunus Cerasus*) Çekirdeği Yağı, Çörek Otu (*Nigella Sativa*) Yağı ve Toros Göknarı (*Abies Cilicica Carr.*) Reçinesinin Yara İyileşmesine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye.
- Han MC, Durmuş AS, Sağlıyan A ve ark. (2017).** Effects of *Nigella sativa* and *Hypericum perforatum* on wound healing. *Turk J Vet Anim Sci*, 41, 99-105.
- Hancıoğlu S (2018).** Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Tam Kat Cilt Kesisinde Ankaferd Blood Stopper Ampul Uygulamasının Yara İyileşmesi Üzerine Histopatolojik ve Mekanik Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye.
- Herman TF, Bordonni B (2022).** Wound Classification. StatPearls Publishing LLC, Treasure Island (FL).
- Jin L, Ma Y, Wang R ve ark. (2022).** Nanofibers and hydrogel hybrid system with synergistic effect of antiinflammatory and vascularization for wound healing. *Mater Today Adv*, 14, 1-9.
- Karasu A, Bakır B (2016).** The Effect of Octyl-Cyanoacrylate in Wound Healing at Closing the Experimentally Formed Skin Incision in Rabbits. *Van Vet J*, 27 (1), 5-9.
- Kuranel E (2012).** *Plantago Lanceolata* Bitkisinin Yara İyileştirici Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye.
- Kurtoğlu AH, Karataş A (2009).** Current Approaches To Wound Therapy: Modern Wound Dressings. *J Fac Pharm Ankara*, 38 (3), 211-232.
- Kuzay H (2019).** Evde Bakımda Kronik Yara Bakımı Verenlerin Özellikleri ve Kronik Yara Bakımında Kullandığı Yöntemlerin Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye.
- Li M, Liang Y, He J, Zhang H, Guo B (2020).** Two-Pronged Strategy of Biomechanically Active and Biochemically Multifunctional Hydrogel Wound Dressing To Accelerate Wound Closure and Wound Healing. *Chem Mater*, 32 (23), 9937-9953.
- Mutlu S, Yılmaz E (2019).** Yara Yönetiminde Yenilikçi Yaklaşımlar. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8 (4), 481-494.
- Negut I, Grumezescu V, Grumezescu Am (2018).** Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules*, 23 (9), 1-23.
- Özel GŞ (2018).** Kedi ve Köpeklerde Akut ve Kronik Yaraların İyileşiminde Düşük Doz Lazer Tedavisinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Özkorkmaz EG, Özay Y (2009).** Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2), 63-67.
- Parsak CK, Sakman G, Çelik Ü (2007).** Yara İyileşmesi, Yara Bakımı ve Komplikasyonları. *Arşiv*, 16, 145-159.
- Rızalar S, Tural BE, Kaplan Uzunkaya G, Şahin R, As T (2019).** Hemşirelerin Yara Bakım Uygulamaları Üniversite Hastanesi Örneği. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*, 12 (3), 163-169.
- Smith W (1993).** Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. *Lab Anim*, 27, 30-39.
- Şındak N, Akgül MB, Gülaydın A, Karakoç Z (2017).** Effects of Topical Terebinth Berry Oil and Different Experimental Mixtures on Wound Healing in Japanese Quails (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Van Vet J*, 28 (2), 69-74.
- Uyar A, Akyol T, Yaman T, Keleş ÖF (2017).** Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yara Modelinde Civanperçemi (*Achillea millefolium*) Bitkisinin Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması. *Van Vet J*, 28 (3), 157-163.
- Zeng J, Chen X, Zhang J ve ark. (2022).** Stem cell spheroids production for wound healing with a reversible porous hydrogel. *Mater Today Adv*, 15, 1-13.