

BALIKESİR
SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ
BALIKESİR HEALTH SCIENCES JOURNAL



BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISSN:2146-9601
E-ISSN:2147-2238

CİLT | 11 | SAYI | Supplement
VOLUME | 11 | ISSUE | Congress Issue

Supplement 1 | 2022

YAYIN KURULU VE İLETİŞİM
SAHİBİ / OWNER

Balıkesir Üniversitesi adına / On behalf of Balıkesir University

Rektör / Rector

Prof. Dr. İlder KUŞ

EDİTÖRLER / EDITORS

Prof. Dr. Osman İrfan İLHAK

Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Uğur AYDOĞDU

Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Celalettin ÇEVİK

Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Doç. Dr. Raziye ÖZDEMİR

Karabük Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY

Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi

EDİTÖR KURULU / EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ
Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Haki KARA
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. İzzet KARAHAN
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Kadir SERVİ
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Levent ALTINTAŞ
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Dilek AKŞİT
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

YAZIM EDİTÖRLERİ / WRITING EDITORS

Ar. Gör. Dr. Deniz Aslı DOKUZCAN
Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Ar. Gör. Dr. Tuba KIZILKAYA
Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Ar. Gör. Hasan SUSAR
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

DİL EDİTÖRLERİ / LANGUAGE EDITORS

Prof. Dr. Hasan ÖZEN
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi

İSTATİSTİK EDİTÖRÜ / STATISTICS EDITOR

Doç. Dr. Celalettin ÇEVİK
Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

TEKNİK EDİTÖRLER / TECHNICAL EDITORS

Doç. Dr. Uğur AYDOĞDU
Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Celalettin ÇEVİK
Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Doç. Dr. Raziye ÖZDEMİR
Karabük Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi

İLETİŞİM ADRESİ / CORRESPONDENCE ADDRESS

Prof. Dr. Osman İrfan İLHAK

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çağış Yerleşkesi 10145 BALIKESİR

Faks: (0266) 612 10 09 **E-posta:** irfan.ilhak@balikesir.edu.tr, bsbd@balikesir.edu.tr

Web: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Sayfa Numarası	ORJİNAL ARAŞTIRMALAR / ORIGINAL RESEARCH ARTICLES
1-6	Ratlarda Nikel Sülfatın Genotoksisitesine Karşı Likopenin Koruyucu Etkisi Protective Effect of Lycopene Against Genotoxicity of Nickel Sulphate in Rats Zozan GARİP, Füsün TEMAMOĞULLARI, Pınar Aksu KILIÇLE
7-14	Determination of Aflatoxin and Heavy Metal Levels in Some Spices Sold as Unpackaged in Van Province and Health Risks Assessment of Heavy Metals Van İlinde Ambalajsız Olarak Satılan Bazı Baharatlarda Aflatoksin ve Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi ve Ağır Metallerin Sağlık Risklerinin Değerlendirilmesi Ufuk MERCAN YÜCEL
15-21	Karadeniz Suyunda Yetişen Kalkan (Psetta maxima) Balıklarında Florfenikol'ün Farmakokinetiğinin Belirlenmesi Determination of the Pharmacokinetics of Florfenicol in Turbot (Psetta maxima) Fish Grown in Black Sea Water Erkan TAÇBAŞ, Emine BAYDAN, Mustafa TÜRE, İlyas KUTLU, Cemil ALTUNTAŞ, Gözde Yücel TENKEKİ, Farah Gönül AYDIN, Emre ARSLANBAŞ
22-28	Propil Tiyourasil (PTU) ve L-Tiroksin ile Oluşturulan Deneysel Hipo- ve Hipertiroidizm Erişkin Sıçanların Hipokampusunda Doku Lipid Peroksidasyonu, Glutasyon ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Araştırmalar Investigations on Tissue Lipid Peroxidation, Glutathione and Antioxidant Enzyme Levels in the Hippocampus of Adult Rats in Experimental Hypo- and Hyperthyroidism Induced by Propyl Thiouracil (PTU) and L-Thyroxine Bilal Cem LİMAN, Narin LİMAN, Muhammed Yasin TEKELİ, Ergül ERGEN, Ural Kemal KAVRAAL
29-37	Çevresel Kirlenmeler ve Plasental Transporterler: PCB ile SLC ve ABCB1 Örneği Environmental Contaminants and Placental Transporters: Example of PCB vs. SLC and ABCB1 Begüm YURDAKÖK DİKMEN, Recep UYAR, Özgür KUZUKIRAN, Mehmet Altay ÜNAL, Hasan Tolga ÇELİK, Ümmü Gülsüm BOZTEPE, Kübra KARAKAŞ ALKAN, Özgür ÖZYÜNCÜ, Yağmur TURGUT BİRER, Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ, Halit KANCA, Çağdaş AKTAN, Ayhan FİLAZİ
DERLEMELER / REVIEWS	
38-43	Arı ve Arı Ürünlerinde İlaç, Pestisit ve Metallerin Etkisi ve Kontaminasyonu The Effect and Contamination of Drugs, Pesticides and Metals in Bee and Bee Products Mehmet ÖZÜÇLİ
44-50	Hünnap (Ziziphus jujuba) Meyvesinin Biyolojik Etkinliği ve Kimyasal Bileşimi Biological Activity and Chemical Composition of Jujuba (Ziziphus jujuba) Fruit Serkan KORKUT, Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI, Adnan ADİL HİŞMİOĞULLARI
51-58	Tek Sağlık Uygulamalarının Değerlendirilmesi: Standardize Edilmiş Güncel Yöntemler Evaluation of One Health Implementations: Current Standardized Frameworks Pınar ŞAHİNTÜRK
59-63	Sucul Ortamlarda Nanopartikül Toksikitesi Nanoparticle Toxicity in Aquaculture İlker ŞİMŞEK, Özgür KUZUKIRAN, Ayhan FİLAZİ
64-73	Tanenler: Silajlarda ve Hayvan Besleme Uygulamalarında Kullanımı The Usage of Tannins to Silages and Animal Nutrition Practices Oğuz Koray BACAĞIZ, Mehmet Ali AZMAN

Dergimizin bu sayısı (Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi (BAUN Sağ. Bil Derg) 2022; 11 (Supplement 1))'nda yer alan makaleler Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi ev sahipliğinde, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji iř birliği ile **07-10 Eylül 2022** tarihinde Balıkesir, Burhaniye'de gerçekleştirilen **II. Uluslararası VII. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (II. International VII. National Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress)**'nde sözlü olarak sunulmuştur.



ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1144724>



Ratlarda Nikel Sülfatın Genotoksitesine Karşı Likopenin Koruyucu Etkisi

Zozan GARİP ¹, Füsun TEMAMOĞULLARI ¹, Pınar AKSU KILIÇLE ²

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

²Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Geliş Tarihi / Received: 17.07.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 16.09.2022

ÖZ

Amaç: Endüstrilerde geniş kullanım yeri olan nikelin teratojenik, kanserojenik, immünotoksik ve genotoksik etkileri vardır. Bu çalışmada, nikel sülfatın sebep olduğu genotoksitesine karşı antioksidan özelliğe sahip likopenin koruyucu etkileri araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmada toplam 24 adet rat (Wistar albino) dört gruba ayrılmıştır. Grup I (kontrol) günlük olarak serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) ve mısır yağı oral gavajla (0.5 ml); Grup II nikel sülfat (20 mg/kg, i.p.) serum fizyolojik içerisinde çözülürken; Grup III likopen mısır yağı (0.5 ml) süspansiyon haline getirilerek 20 mg/kg dozlarında oral gavajla; Grup IV likopen mısır yağı (0.5 ml) içerisinde süspansiyon haline getirilerek 20 mg/kg dozlarında oral gavajla verildikten 2 saat sonra nikel sülfat (20 mg/kg, i.p.) 21 gün boyunca uygulanmıştır. Genotoksitesite testlerinden biri olan kemik iliğinden mikronükleus testiyle mikronükleuslu polikromatik eritrositler (MNPCE) ve polikromatik eritrositler (PCE) incelenmiştir. **Bulgular:** Koruyucu amaçlı olarak likopen uygulamasının MNPCE düzeylerini nikel sülfat grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.001$) düşürdüğü belirlenmiştir. **Sonuç:** Likopenin 20 mg/kg dozunda uygulanmasının nikel sülfatın meydana getirdiği genotoksik etkiyi azalttığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Genotoksitesite, Likopen, Nikel, Rat.

Protective Effect of Lycopene Against Genotoxicity of Nickel Sulphate in Rats

ABSTRACT

Aim: Nickel, which has a wide usage area in industries, has teratogenic, carcinogenic, immunotoxic, and genotoxic effects. In this study, the protective effects of lycopene, which has antioxidant properties, were investigated against genotoxicity caused by nickel sulphate. **Materials and Methods:** In the study, a total of 24 rats (Wistar albino) were divided into four groups: Group I (control) was given daily saline intraperitoneally (i.p.) and corn oil orally by gavage (0.5 ml); Group II was given nickel sulphate (20 mg/kg, i.p.) dissolved in physiological saline; Group III was given lycopene suspended in corn oil (0.5 ml) by oral gavage at 20 mg/kg doses; Group IV was given both lycopene suspended in corn oil (0.5 ml) by oral gavage at 20 mg/kg doses, and 2 hours later, nickel sulphate (20 mg/kg, i.p.) for 21 days. Micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and polychromatic erythrocytes (PCE) were examined by bone marrow micronucleus test, which is one of the genotoxicity tests. **Results:** It was determined that the administration of lycopene for preventive purposes decreased the MNPCE levels significantly ($p<0.001$) compared to the nickel sulphate group. **Conclusion:** Administration of lycopene at a dose of 20 mg/kg is protective against the genotoxic effects of nickel sulphate.

Keywords: Genotoxicity, Lycopene, Nickel, Rat.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Zozan GARİP, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

E-mail: garipzozan@gmail.com

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Garip, Z., Temamoğulları, F., Kılıçle, P. A. (2022). Ratlarda nikel sülfatın genotoksitesine karşı likopenin koruyucu etkisi. *BAUN Health Sci J*, 11(Supplement 1): 1-6.

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1144724>



BAUN Health Sci J 2022 OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Endüstriyel gelişmelerle birlikte artan çevre kirliliği küresel bir sorundur (Timothy ve Tagui Williams, 2019). Modern endüstrilerde geniş kullanım alanına (elektrik-elektronik, otomotiv, kimya, enerji, ulaşım ve tıbbi gereçler vb.) sahip olan nikel çevre kirliliğinde etkili ağır metallerden biridir (Das ve ark., 2018; Genchi ve ark., 2020). Çevre kirliliğine ve beslenmeye bağlı olarak insan ve hayvanlar nikel farklı yollarla maruz kalmaktadır. Çeşitli çalışmalarda nikelin immünotoksik, teratojenik, kanserojenik ve genotoksik etkileri vurgulanmıştır (Ijomone ve ark., 2018; Kim ve ark., 2018; Usman ve ark., 2022). İnsan ve hayvan sağlığında alerjik dermatit, böbrek ve kardiyovasküler hastalıklara, akciğer fibrozu, akciğer ve burun kanseri ile üreme sistemi üzerinde nikel olumsuz etkiye yol açmaktadır (Genchi ve ark., 2020). Çevre kirlenmelerinin sağlık üzerinde meydana getirdiği olumsuzluklara karşı yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip besin takviyelerinin kullanılabileceği ifade edilmiştir (Hennig ve ark., 2018). Likopen antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, antidiyabetik ve hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nöroprotektif özelliklere sahip bir karotenoiddir (Imran ve ark., 2020; Khan ve ark., 2021). Bu çalışmada, nikelin oluşturduğu genotoksitesiteye karşı likopenin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları

Çalışmada 24 adet sağlıklı erkek rat (Wistar albino, 6 haftalık, 200±20 g ağırlığında) Harran Üniversitesi Hayvan Deneyi Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvar Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Laboratuvar koşullarına 7 gün adaptasyonları sağlanarak standart laboratuvar şartlarında 12 saat karanlık/aydınlık döngü olacak şekilde, 23±2°C, %60–65 nemde, pelet yem (protein (%22.21), yağ (%3.32), fiber (%3.12), karbonhidrat (%68), vitamin ve mineral) ve su *ad libitum* beslenme yapıldı.

Deney grupları ve deneysel işlemler

Ratlar rastgele dört gruba ayrıldı. Grup I kontrol günlük olarak serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) ve mısır yağı (0.5 ml) oral gavajla (Ateşşahin ve ark., 2006); Grup II nikel sülfat (Acros organik nikel sülfate heptahydrate, Lot: A0371683, kod:270552500) (20 mg/kg, canlı ağırlık (c.a), günlük, i.p.) serum fizyolojik içerisinde çözülürerek (Temamoğulları ve ark., 2022) Grup III Likopen (Redivivo TM, kod 7803, DSM Nutritional Products, İstanbul, Turkey) mısır yağı (0.5 ml) süspansiyon haline getirilerek 20 mg/kg dozlarında oral gavajla (Jiang ve ark., 2016; Sharma ve Vijaya, 2015) Grup IV likopen mısır yağı (0.5 ml) içerisinde süspansiyon haline getirilerek 20 mg/kg dozlarında oral gavajla verildikten 2 saat sonra nikel sülfat (20 mg/kg, c.a, günlük, i.p.) 21 gün boyunca uygulandı (Adeyemi ve ark., 2017; Deng ve

ark., 2012). Hayvanlar deneme sonunda (22. gün) dekapitasyon yöntemiyle ötenazi edildi.

Mikronükleus testi

Çalışmada Schmid (1975) tarafından geliştirilen yöntemle göre iki ucundan kesilen femur kemiğinden kemik iliği içerisinde 3 ml fetal dana serumu bulunan santrifüj tüpe aktarıldı. Tüpler 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar atılarak tüpte kalan kısmın üzerine bir damla dana serumu konuldu. Süspansiyon edilen kısımdan alınan bir damla örnek temiz lamlar üzerine yayıldı (Şekil 1). Lamlar havada kurutuldu. Fiksasyon işlemi 10 dakika metil alkolde gerçekleştirildi (Schmid, 1975).



Şekil 1. Rat femurunda kemik iliği örneğinin alınması, süspansiyon edilen kısımdan alınan bir damla örneğin temiz lamlar üzerine yayılması

Boyama işlemi

Fikse edilmiş preparatlar 5'er dakika sırasıyla %0.25'lik May Grunwald ve %0.125'lik May Grunwald boyası ile boyandıktan sonra saf suyla yıkandı. Boyama işlemi preparatların 30 dakika %20'lik Giemsa boyası ile boyanıp, yıkanması ve kurumaya bırakılmasıyla tamamlandı. Preparatlar 1000 büyütmede ışık mikroskopunda, her preparattan rastgele 2000 adet polikromatik eritrositler (PCE) sayılarak gerçekleştirilmiştir. Bunların içerisinde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin (MNPCE) sayıları belirlenerek, yüzdeleri çıkartılmıştır (Aksu ve ark., 2013).

İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçlarının normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Kolmogorow-Smirnov normallik testi yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS 22 programı kullanılarak yapıldı. Deney grubu ortalamaları arasında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve eğer deney grupları ortalamaları arasında farklılık varsa gözlenen bu farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığının saptanması

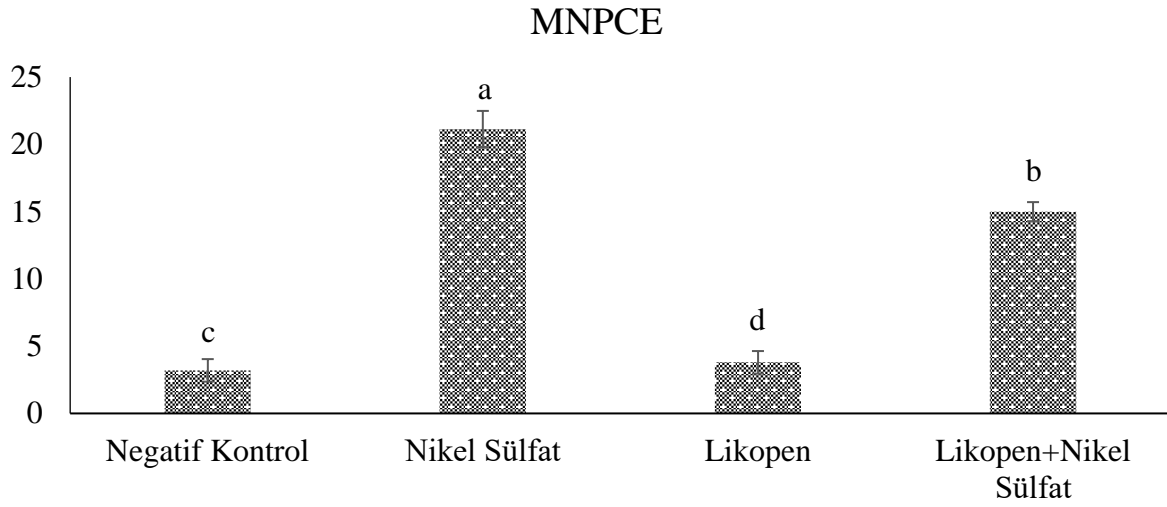
için grup ortalamaları üzerinde 'ANOVA-Tukey' testi uygulandı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Araştırmanın etik yönü

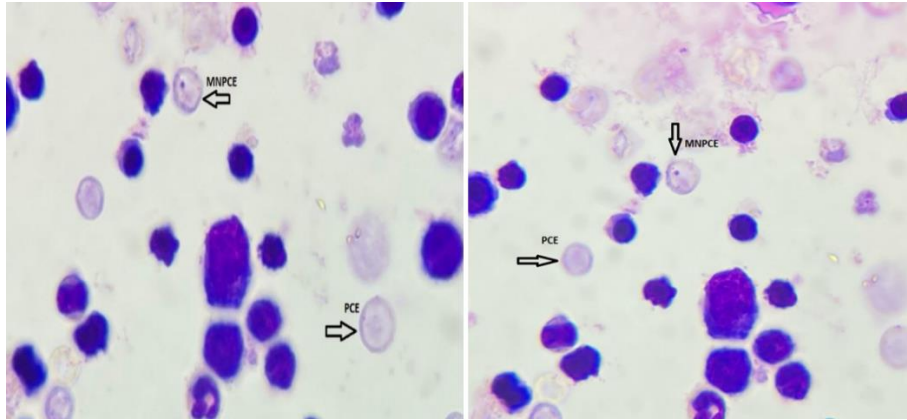
Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (Toplantı tarihi:23.06.2022; Oturum no: 2022/05; Karar: 01-06) etik izin alınmıştır.

BULGULAR

Ratlarda nikel sülfat ve likopen uygulamaları neticesinde elde edilen MNPCE sayılarının istatistiksel analizlerinden elde edilen veriler incelendiğinde, nikel sülfat uygulanan gruptaki hayvanların MNPCE sayılarının diğer gruplara oranla daha yüksek olduğu ($p < 0.001$) (Şekil 2), koruyucu amaçlı olarak likopen uygulamasının ise MNPCE sayılarını nikel sülfat grubuna göre düşürdüğü ($p < 0.001$) (Şekil 2) belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Negatif kontrol ve uygulama gruplarındaki hayvanlara ait 2000 adet Polikromatik Eritrosit (PCE) sayılarak gerçekleştirilen çalışmada MNPCE sayıları (Ortalama±standart sapma, farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir)



Şekil 3. Oklar ratların kemik iliğinde 1000 büyütmede ışık mikroskopunda Polikromatik Eritrosit (PCE), Mikronükleer Polikromatik Eritrosit (MNPCE) görüntüleri

TARTIŞMA

Bilindiği gibi çeşitli karsinojen ajanlara maruziyet genotoksitesine ve mutajeniteye sebep olmaktadır. Oluşan genotoksik veya mutajenik etkilerin belirlenmesi amacıyla Ames testi, Comet testi, kromozom aberasyon testi, kardeş kromatid değişimi

testi ve mikronükleus (MN) gibi çeşitli testler kullanılmaktadır. MN testi, kimyasal karsinojenlerin kemik iliği kullanılarak hücrelerde meydana getirdiği yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri ve genomik kararsızlığın gösterilmesinde kullanılan bir biyozlem testidir. Genotoksitesinin

belirlenmesinde mikronükleus testi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan güvenli, hızlı ve geniş kullanım alanı olan bir testtir (Şekeroğlu ve Atli-Şekeroğlu, 2011; Zhivagui ve ark., 2016). Endüstrilerde yaygın kullanım alanına sahip ağır metallere biri olan nikel, özellikle meydana getirdiği oksidatif hasar ile DNA zincirini, çapraz bağlarını ve onarım mekanizmasını bozarak kanserojeniteye sebep olmaktadır. Nikel bileşiklerinin *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışmada genotoksik etkisi ortaya konulmuştur (Guo ve ark., 2019; Zhu ve Costa, 2020). Mevcut çalışmada nikel uygulanan grupta MNCE sayısındaki artış nikel sülfatın genotoksisite meydana getirdiği ve diğer çalışmalarla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Beslenmenin, çevresel kirlenmelerin aracılık ettiği doku hasarı, reaktif oksijen türleri ve serbest radikalleri temizlemesiyle sitotoksisite mekanizmalarını iyileştirdiği, hücrelerdeki lipid seviyesini, antioksidan durumu ve oksidatif stresi önleyebileceği ifade edilmiştir (Lourenço ve ark., 2019). Antioksidan potansiyeli sahip likopenin kanser, nörodejenerasyon ve osteoporoz gibi kronik hastalık durumlarında oksidatif hasarı iyileştirmek amacıyla nutrasötik olarak kullanımına olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Imran ve ark., 2020). Özellikle düşük oksijenli peroksil radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu engelleyici etkisi bulunmaktadır (Tchonkouang ve ark., 2022). Likopenin kanser önleyici etkisi, serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girmesiyle açıklanmıştır (Yasmeen ve ark., 2022; Tchonkouang ve ark., 2022). Temamoğulları ve ark., (2022) ratlarda MN testi ile yaptığı çalışmada, 20 mg/kg nikel sülfat uygulanan grupta MNPCE sayısını 20.33±1.03 olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca 20 mg/kg bromelainin genotoksisiteye karşı etkili olmadığı belirtilmiştir. Mevcut çalışmada benzer şekilde nikel uygulanan grupta MNPCE sayısı 21.14 olarak belirlenmiş ve likopenin koruyucu etkisinin anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu farklılık koruyucu amaçla kullanılan maddelerin antioksidan potansiyelleri ile uygulama sürelerinin farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Temamoğulları ve ark., 2022). Genotoksik etkiye sahip kapsaisin meydana getirdiği mutajeniteye karşı 2 mg/kg likopenin lipid peroksidasyonu ve kemik iliğinde MN sayısını düşürdüğü belirtilmiştir (Banji ve ark., 2013). Comet testiyle yapılan çalışmada, 15 mg/kg likopenin lenfositlerdeki DNA hasarını iyileştirdiği tespit edilmiştir (Torbergsen ve Collins, 2000). Likopenin (1µM, 3µM, 5µM, 10 µM konsantrasyon) mutajen bir madde olan etil metan sulfonat karşı soğan kök hücrelerinde doza bağlı olarak kromozom hasarını azalttığı ve koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (Aslantürk, 2003). Farelerde, yapısında likopen bulunan karpuzun siklofosamid kaynaklı genotoksik etkiye karşı MNPCE sıklığını azaltarak doğal antigenotoksik olduğu ifade edilmiştir (Asita ve Molise, 2011). Ratlarda ferrik

nitrilotriasetatın meydana getirdiği DNA hasarının 10 mg/kg likopen ön tedavi uygulanan grupta daha az olduğu ifade edilmiştir (Matos ve ark., 2001). Yine yapılan başka bir çalışmada nikel maruz kalan ratlarda MNPCE sayısının arttığı ve Omega-3 yağ asitleri uygulamasının MNPCE sayısını düşürdüğü, genotoksik etkiyi azalttığı belirtilmiştir (Owumi ve ark., 2019).

SONUÇ

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, birçok kimyasal maddenin en düşük miktarlarının bile genotoksik ve mutajenik olabileceği rapor edilmiştir. Bundan dolayı, belirtilen etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan kimyasal ajanların insan ve hayvanlarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere neden olup olmadıklarının ortaya çıkarılması ve bu etkilere karşı antimutajenik, antikarsinojenik ve antiteratojenik olarak alınması gereken maddeler, önlemler son derece önemlidir. Yapılan bu çalışma sonucunda; nikel sülfatın genotoksik etkisine karşı likopenin (20 mg/kg) MNPCE sayılarını, nikel sülfat grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü, nikel sülfatın uygulanan dozuna (20 mg/kg) karşı potansiyel olarak koruyucu olduğu söylenebilir. Likopen ve nikel sülfat kimyasalları üzerinde yapılan mikronükleus testi dışında, diğer *in vivo* ve *in vitro* kısa zamanlı genotoksisite testlerinde gerçekleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: ZG, FT; **Gereç, yöntem ve veri toplama:** ZG, FT; **Veri analizi ve yorum:** PAK; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** ZG, FT, PAK.

Finansal Destek

Bu araştırma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Adeyemi, O. S., Aroge, C. S., & Akanji, M. A. (2017). Moringa oleifera-based diet protects against nickel-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Biomedical Research*, 31(4), 350–357. <https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160051>.
- Aksu, P., Doğan, A., Gül, S., & Kanıcı, A. (2013). Farelerde 3-Metilkolantren ile indüklenen fibrosarkoma üzerine sisteminin etkileri: Genotoksisitenin araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(6), 955–961. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.9172>.
- Asita, A. O., & Molise, T. (2011). Antimutagenic effects of red apple and watermelon juices on cyclophosphamide-induced genotoxicity in mice. *African Journal of Biotechnology*, 10(77), 17763–17768. <https://doi.org/10.5897/AJB11.756>.

- Aslantürk, Ö. S. (2003). Likopenin kromozom hasarını değiştirici etkilerinin araştırılması. (Yüksek Lisans tezi). <http://hdl.handle.net/11607/98>.
- Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., & Çeribaşı, A. O. (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, 21(1), 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.05.003>.
- Banji, D., Banji, O. J., Reddy, M., & Annamalai, A. R. (2013). Impact of zinc, selenium and lycopene on capsaicin induced mutagenicity and oxidative damage in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(3), 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.01.001>.
- Das, K. K., Reddy, R. C., Bagoji, I. B., Das, S., Bagali, S., Mullur, L., Khodnapur, J. P., & Biradar, M. S. (2018). Primary concept of nickel toxicity - An overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(2), 141-152. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2017-0171>.
- Deng, Y., Xu, Z., Liu, W., Yang, H., Xu, B., & Wei, Y. (2012). Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biological Trace Element Research*, 146(2), 213-223. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9242-3>.
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>.
- Guo, H., Liu, H., Wu, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2019). Nickel carcinogenesis mechanism: DNA damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4690. <https://doi.org/10.3390/ijms20194690>.
- Hennig, B., Petriello, M. C., Gamble, M. V., Surh, Y. J., Kresty, L. A., Frank, N., Rangkadilok, N., Ruchirawat, M., & Suk, W. A. (2018). The role of nutrition in influencing mechanisms involved in environmentally mediated diseases. *Reviews on Environmental Health*, 33(1), 87-97. <https://doi.org/10.1515/reveh-2017-0038>.
- Ijomone, O. M., Olatunji, S. Y., Owolabi, J. O., Naicker, T., & Aschner, M. (2018). Nickel-induced neurodegeneration in the hippocampus, striatum and cortex; an ultrastructural insight, and the role of caspase-3 and α -synuclein. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.017>.
- Imran, M., Ghorat, F., Ul-haq, I., Ur-rehman, H., Aslam, F., Heydari, M., Shariati, M. A., Okuskhanova, E., Yessimbekov, Z., Thiruvengadam, M., Hashempur, M. H., & Rebezov, M. (2020). Lycopene as a natural antioxidant used to prevent human health disorders. *Antioxidants*, 9(8), 1-27. <https://doi.org/10.3390/antiox9080706>.
- Jiang, W., Guo, M. H., & Hai, X. (2016). Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46), 10180-10188. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10180>.
- Khan, U. M., Sevindik, M., Zarrabi, A., Nami, M., Ozdemir, B., Kaplan, D. N., Selamoglu, Z., Hasan, M., Kumar, M., Alshehri, M. M., & Sharifi-Rad, J. (2021). Lycopene: Food sources, biological activities, and human health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2713511. <https://doi.org/10.1155/2021/2713511>.
- Kim, H., Loftus, J. P., Gagné, J. W., Rutzke, M. A., Glahn, R. P., & Wakshlag, J. J. (2018). Evaluation of selected ultra-trace minerals in commercially available dry dog foods. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 9, 43. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S165890>.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- Matos, H. R., Capelozzi, V. L., Gomes, O. F., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. (2001). Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396(2), 171-177. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2611>.
- Owumi, S. E., Olayiwola, Y. O., Alao, G. E., Gbadegesin, M. A., & Odunola, O. A. (2019). Cadmium and nickel co-exposure exacerbates genotoxicity and not oxidoinflammatory stress in liver and kidney of rats: Protective role of omega-3 fatty acid. *Environmental toxicology*, 35(2), 231-241. <https://doi.org/10.1002/tox.22860>.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1), 9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8).
- Şekeroğlu, V., & Atli-Şekeroğlu, Z. (2011). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi Micronucleus test for determining genotoxic damage. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2011.06977>.
- Sharma, S., & Vijaya, P. (2015). Ameliorating potential of lycopene against cadmium toxicity in kidney of albino mice. *International Journal of Advanced Research*, 3(2), 766-770.
- Tchonkouang, R. D. N., Antunes, M. D. C., & Vieira, M. M. C. (2022). Potential of carotenoids from fresh tomatoes and their availability in processed tomato-based products. In Martínez-Espinosa, R.M (Ed.), *Carotenoids-New Perspectives and Application [Working Title]*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103933>.
- Temamoğulları, F., Aksu Kılıçle, P., Gürler, Ş., & Garip, Z. (2022). Effect of bromelain against nickel genotoxication in rats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 17(1), 26-30. <https://doi.org/10.54614/VetSciPract.2022.1050128>.
- Timothy, N., & Tagui Williams, E. (2019). Environmental pollution by heavy metal: An overview. *International Journal of Environmental Chemistry*, 3(2), 72-82. <https://doi.org/10.11648/j.ijec.20190302.14>.
- Torbergson, A. C., & Collins, A. R. (2000). Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *European Journal of Nutrition*, 39(2), 80-85. <https://doi.org/10.1007/s003940050006>.

- Usman, M., Murtaza, B., Natasha, N., Imran, M., Abbas, G., Amjad, M., Shahid, M., Ibrahim, S. M., Owens, G., & Murtaza, G. (2022). Multivariate analysis of accumulation and critical risk analysis of potentially hazardous elements in forage crops. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09799-8>.
- Yasmeen, N., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2022). Lycopene. In J. Kour & G. A. Nayik (Eds.), *Nutraceuticals and health care* (pp. 115–134). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-03223-8>.
- Zhivagui, M., Korenjak, M., & Zavadil, J. (2016). Modelling mutation spectra of human carcinogens using experimental systems. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *121*, 16–22. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12690>.
- Zhu, Y., & Costa, M. (2020). Metals and molecular carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *41*(9), 1161–1172. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa076>.



ORIJINAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1160866>



Determination of Aflatoxin and Heavy Metal Levels in Some Spices Sold as Unpackaged in Van Province and Health Risks Assessment of Heavy Metals

Ufuk MERCAN YÜCEL ¹

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology

Geliş Tarihi / Received: 11.08.2022, *Kabul Tarihi / Accepted:* 16.09.2022

ABSTRACT

Aim: This study aimed to determine the aflatoxin and heavy metal levels in the samples of unpackaged red pepper, black pepper and cumin sold in Van and to estimate the health risks of heavy metals. **Materials and Methods:** In 60 samples (20 of each spice sample) obtained from herbal shops and markets, aflatoxin analysis was done with HPLC device and heavy metal analysis was done with ICP-MS device. **Results:** Although AFG₁ and AFG₂ were not detected in all spice samples, AFB₁ and AFB₂ were not detected in all cumin samples, AFB₁ was detected in all red pepper samples and only one black pepper samples, and AFB₂ in 18 red pepper samples. As a result of heavy metal analysis, the average concentration of Ni, Cd, Pb and Al were 5.08, 0.35, 2.47, 392.45 ppm in black pepper, 9.12, 0.20, 1.40, 514.4 ppm in cumin and 8.95, 0.06, 0.11, 33.75 ppm in red pepper, respectively. Arsenic was detected only in cumin and its average concentration was 0.06 ppm. **Conclusion:** In 90% (18 samples) of red pepper samples, AFB₁ was detected above the permissible limit value in Turkish food codex. The Cd level in black pepper samples and Ni levels in all spice samples determined in this study were above the limit values. According to daily intake tolerance limits, although Ni, As, and Cd levels in spices do not pose any risk, Al in all spice samples and Pb levels in black pepper samples are above the daily intake tolerance limits. Spice samples do not pose risk of non-carcinogenic effects, as THQ exposure values are less than 1. **Keywords:** Spice, Aflatoxin, Heavy Metal, Health Risk Assessment.

Van İlinde Ambalajsız Olarak Satılan Bazı Baharatlarda Aflatoksin ve Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi ve Ağır Metallerin Sağlık Risklerinin Değerlendirilmesi

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Van ilinde ambalajsız olarak satılan kırmızıbiber, karabiber ve kimyon çeşitlerindeki aflatoksin ve ağır metal düzeylerinin belirlenmesi ve ağır metallerin sağlık risklerinin tahminlerinin yapılmasıdır. **Gereç ve Yöntem:** Aktarlardan ve marketlerden toplanan 60 adet örnekte (her baharat örneğinden 20'şer adet) aflatoksin analizi HPLC cihazı ile ağır metal analizi ise ICP-MS cihazı ile yapılmıştır. **Bulgular:** Baharat örneklerinin tümünde AFG₁ ve AFG₂, kimyon örneklerinin tümünde AFB₁ ve AFB₂ tespit edilmediği halde, kırmızıbiber örneklerinin tümünde, karabiber örneklerinin sadece 1 tanesinde AFB₁ ve kırmızıbiber örneklerinin 18 tanesinde AFB₂ belirlenmiştir. Ni, Cd, Pb ve Al'un ortalama değerleri sırasıyla karabiberde 5.08, 0.35, 2.47, 392.45 ppm, kimyonda 9.12, 0.20, 1.40, 514.4 ppm ve kırmızı biberde 8.95, 0.06, 0.11, 33.75 ppm olarak tespit edilmiştir. Arsenik ise sadece kimyonda tespit edilmiştir ve ortalama değeri 0.06 ppm'dir. **Sonuç:** Kırmızı biberlerin %90'ında (18 örnek) Türk Gıda Kodeksinde izin verilen sınır değerinin üzerinde AFB₁ saptanmıştır. Karabiberde tespit edilen Cd ve tüm baharat örneklerindeki Ni düzeyi maksimum izin verilebilir sınır değerlerin üzerindedir. Günlük alım tolerans limitleri göre baharatlardaki Ni, As ve Cd düzeyleri herhangi bir risk oluşturmadığı halde tüm baharat örneklerinde Al, karabiber örneklerinde Pb düzeyi günlük alım tolerans limitlerinin üstündedir. THQ maruziyet değerleri, 1'den küçük olduğu için baharat örnekleri kanserojen olmayan etki riski taşımamaktadır. **Anahtar Kelimeler:** Baharat, Aflatoksin, Ağır Metal, Sağlık Riski Değerlendirmesi.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ufuk MERCAN YÜCEL, Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Van, Türkiye.

E-mail: umercan@yyu.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Mercan Yücel, U. (2022). Determination of aflatoxin and heavy metal levels in some spices sold as unpackaged in van province and health risks assessment of heavy metals. *BAUN Health Sci J*, 11(Supplement 1): 7-14. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1160866>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

INTRODUCTION

Spices, which consist of leaves, flowers, seeds or juices of plants, are food additives with specific odors and flavors, used to increase appetite, facilitate digestion and for preservative purposes. Spices, which are widely used in the food industry and at home, play an important role in the aroma and flavor change of foodstuffs (Uner et al., 2000). Most of the spices used in food production are contaminated to varying degrees by mold spores, yeasts and bacteria (Gecan et al., 1986). Molds, which can resist preservation and storage techniques such as heating, freezing, antibiotic and radiation application, cause mycotoxin formation in foods. Among the mycotoxins, AF is the most important. AF, which can cause acute, subacute and chronic poisoning when ingested by humans and animals, is the substance with the highest potential to cause liver cancer in humans and is evaluated as group I carcinogens by the World Cancer Research Center (IARC) (Hazir & Coksoyler, 1998). Apart from liver cancer, AF also has many important toxic effects such as suppressing the immune system and causing deterioration in protein metabolism (Williams et al., 2004).

Heavy metals are one of the most important food contaminants threatening human health in recent years. The closeness of the cultivation areas to the city, unplanned urbanization, domestic and industrial wastes, heavy metals emitted from the chimney smoke or the exhausts of motor vehicles adversely affect all living things in the ecosystem (Okcu et al., 2009). Heavy metals taken into the body by consuming a food contaminated with heavy metals, depending on the concentration and accumulation in the tissues, it can lead to important health problems in chronic dimensions (Jarup, 2003). Most of the health problems caused by heavy metals are chronic diseases or cancers that require advanced diagnosis and treatment. Toxic heavy metals that people can come into contact with frequently due to daily use and environmental pollution are arsenic, mercury, lead, cadmium, nickel and aluminum (Freedman, 1995).

Prolonged consumption of foods containing high amounts of aflatoxin and heavy metals may pose a problem for public health. For this reason, it is important to determine the levels of aflatoxin and heavy metals in spices such as red pepper, black pepper and cumin, which are consumed by constantly participating in meals, in order to raise awareness of the society and protect consumer health. This study was planned to determine the levels of aflatoxin and heavy metals in red pepper, black pepper and cumin samples used as spices to add flavor to foods in Van province and to predict the health risks of heavy metals. Thus, possible risks in terms of public health were evaluated by revealing the aflatoxin and heavy metal levels in these spice samples.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A total of 60 samples of red pepper (n=20), black pepper (n=20) and cumin (n=20) were obtained from herbal shops and local markets in Van province in 2018. Samples of 50 grams, which were placed in sterile bags, were delivered to the laboratory in a short time.

Measurement of aflatoxin

Analysis of aflatoxin in the samples was performed with high performance liquid chromatography (HPLC) device (Agilent, 1100 series, U.S.A.) with fluorescent detector, after purification using an immunoaffinity column (IAK). As a method, the method of AOAC (2000) (999.07) was used.

Measurement of heavy metals

For determination of heavy metal concentrations, a wet digestion of the dried samples was done according to the method described by Allen (1986) using %65 HNO₃ and HClO₄ mixture. Each sample was weighed about 0.5 g and then combined with a 10 ml of 3:1 acid mixture (HNO₃ and HClO₄). After waiting for a while, the mixture was heated up to 70 °C until a transparent solution was obtained. The clear solution was transferred into 25 ml volumetric flask, and completed to the mark with double distilled deionized water. Blanks were also prepared according to the same digestion procedure for comparison. The metal content analysis of the samples was performed with an ICP-MS device (Thermo Scientific UK, X Series 2). The metal levels in the studied spice samples were compared with the Maximum permissible limits (MPL) in spices determined by WHO/FAO (2007). No maximum limit is specified for Al in spices.

Heavy metal health risk assessment

Estimated Daily Intake (EDI) and target hazard quotient (THQ) calculations were made to determine possible consumer risks from spice consumption. In calculations, average adult body weight was considered to be 60 kg for adult and life expectancy is 70 years (USEPA, 2000). An average daily consumption of 0.01 kg of spices was assumed in this study. This method was adapted because spices are widely consumed as a major part of the diet (Asomugha et al., 2016).

Calculation of the daily heavy metal intake:

$$EDI = (C_{\text{metal}} \times D_{\text{food intake}}) / BW_{\text{average}}$$

Where:

EDI: Estimated daily intake (mg/kg/day)

C - the metal concentration in spices in mg/kg,

D - the daily intake of food in kg person⁻¹ (0.01 kg)

BW - average body weight in kg person⁻¹ (60 kg)

Calculated EDI values were compared with estimated daily intake limits reported by WHO/FAO (2011) and JEFCA (2011). While the instrumental analysis results were used directly for all the metals examined during the calculations, but a different conversion factor was applied for As. Since a significant part of

the As in the tissues is in organic form, they do not show as much toxic effects as inorganic forms (Castro-Gonzalez & Mendez-Armenta, 2008). Therefore, when calculating the possible risk of As level for the consumer, 3% of the total As concentration was used as in previous studies (Traina et al., 2019).

The ratio between the reference dose (RfD) of metals and the exposure to metals represents the Target Hazard Ratio (THQ). THQ; It also expresses the risks of non-carcinogenic effects of the concentrations of metals taken into the body for consumers. THQ calculations were made according to the formula reported by the USEPA (2019).

$$THQ = [(EF \cdot ED \cdot FIR \cdot C) / (RfD \cdot BW \cdot AT)] \cdot 10^{-3}$$

Where:

Efr - exposure frequency in 365 days/year

ED - exposure duration in 70 years (equivalent to an average lifetime)

FIR - average daily consumption in kg/person/day

C - concentration of metal in food sample in mg/kg

RfD - reference dose in mg/kg/day (for Al, As, Cd, Ni ve Pb respectively; 1.00, 0.0003, 0.001, 0.02 ve 0,004) (EPA, 2016)

BW - average body weight in kg person⁻¹ (60 kg)

ATn - average exposure time for non – carcinogens in days (365 day/year x ED).

A total THQ value greater than 1 indicates that there are non-carcinogenic health risks for the consumer (USEPA, 2019).

The HI has been developed to estimate the overall non-carcinogenic risk to human health through exposure of more than one pollutant. HI is the total of the hazard quotients all heavy metals in spices.

$$HI = THQ(Ni) + THQ(As) + THQ(Cd) + THQ(Pb) + THQ(Al)$$

If the values of THQ/HI ≥ 1 indicates that the population will pose potential adverse health effects, while if THQ/HI < 1 , the population is unlikely to experience obvious adverse effect (Mohammadi et al., 2019).

Statistical analysis

Data were analyzed with IBM SPSS V23. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze data with normal distribution. Tukey HSD test was used in multiple comparisons. The Kruskal Wallis test was used to compare data that were not normally distributed. Analysis results are presented as mean \pm standard deviation. The significance level was taken as $p < 0.05$.

Ethical considerations

Ethics committee approval is not required as this study does not fall under the scope of "research that requires ethics committee approval".

RESULTS

The data obtained as a result of aflatoxin analysis in this study were shown in Table 1. As a result of the HPLC analysis, AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 were not detected in cumin.

Table 1. Aflatoxins levels of red pepper samples.

Spice	No	AFB ₁ (ppb)	AFB ₂ (ppb)
Red Pepper	1	8.01	0.80
Red Pepper	2	9.47	0.76
Red Pepper	3	13.51	0.83
Red Pepper	4	12.43	0.81
Red Pepper	5	9.41	0.77
Red Pepper	6	0.29	0
Red Pepper	7	0.47	0
Red Pepper	8	13.66	0.93
Red Pepper	9	11.22	0.82
Red Pepper	10	11.28	0.88
Red Pepper	11	8.07	0.79
Red Pepper	12	8.13	0.76
Red Pepper	13	20.11	0.89
Red Pepper	14	15.21	0.87
Red Pepper	15	19.96	0.99
Red Pepper	16	20.14	1.00
Red Pepper	17	14.32	0.92
Red Pepper	18	11.53	0.86
Red Pepper	19	31.60	1.23
Red Pepper	20	37.49	1.35
Average Concentration		13.81 \pm 8.9	0.81 \pm 0.32

While AFB₂, AFG₁, AFG₂ were not detected in black pepper, low levels of AFB₁ were detected in only one sample. However, although AFG₁ and AFG₂ were not detected in red pepper, high levels of

AFB₁ were detected in all samples and AFB₂ was detected in 18 samples. The amount of AFB₁ in red pepper samples was found to be between 0.286-37.491 ppb (mean 14.2±8.4).

Table 2. Comparison of heavy metal levels in spices (Mean±SD).

Spices	n	Ni (ppm)	As (ppm)	Cd (ppm)	Pb (ppm)	Al (ppm)
Black pepper	20	5.08±1.28 ^a	---	0.35±0.48 ^a	2.47±3.51 ^a	392.45±247.4 ^a
Cumin	20	9.12±6.01 ^b	0.06±0.05	0.20±0.26 ^{ab}	1.40±1.86 ^{ab}	514.4±537.9 ^a
Red Pepper	20	8.95±4.51 ^b	---	0.06±0.01 ^b	0.11±0.05 ^b	33.75±10.01 ^b
MPL (WHO/FAO)		1.63	1.0	0.2	5.0	-

a,b: There is no difference between groups with the same letter on the same line for each parameter.

WHO/FAO - World Health Organization/ Food and Agricultural Organization (2007).

MPL; Maximum permissible limit (ppm)

As a result of heavy metal analysis, the mean level of Ni in black pepper samples was determined to be lower than in other spice samples. Arsenic was

detected only in cumin samples. The mean value of Cd, Pb and Al were lower in red pepper samples compared to the other spice samples (Table 2).

Table 3. Calculated daily intake level of each spices for various metals (mg/kg/day), on assumed 0.01 kg consumed by 60 kg body weight.

Spices	Ni	As	Cd	Pb	Al
Black pepper	8x10 ⁻⁴	---	5x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁴	65x10 ⁻³
Cumin	15x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁴	85x10 ⁻³
Red Pepper	15x10 ⁻⁴	---	1x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁵	6x10 ⁻³
PTDI	50x10 ⁻⁴ (WHO, 2011)	2X10 ⁻³ Anonymous (2022).	20x10 ⁻⁵ (WHO, 2011)	2x10 ⁻⁴ (WHO, 2011)	14x10 ⁻⁴ JECFA (2011)

PTDI: Provisional Tolerable Daily Intake

Table 4. Effect of Daily intake of heavy metal (mg/kg/day) on the consumption of 0.01 kg of spices, effect based on 60 kg of human body weight.

Spices	Ni	As	Cd	Pb	Al
Black pepper	NO EFFECT	NO EFFECT	NO EFFECT	ACUTE	ACUTE
Cumin	NO EFFECT	NO EFFECT	NO EFFECT	NO EFFECT	ACUTE
Red Pepper	NO EFFECT	NO EFFECT	NO EFFECT	NO EFFECT	ACUTE

According to Table 3, Al in all spice samples and Pb level in black pepper samples are above the daily intake tolerance limits. Therefore, all spice samples have the risk of acute toxicity in terms of Al and

black pepper samples in terms of Pb levels if they are consumed continuously.

According to Table 5, THQ and HI values were lower than 1 in all spice samples in this study.

Table 5. THQ and HI values of heavy metals in spices.

Spices	THQ					HI (TTHQ)
	Ni	As	Cd	Pb	Al	
Black pepper	0.042	---	0.058	0.003	0.065	0.168
Cumin	0.076	0.000001	0.033	0.006	0.085	0.200
Red Pepper	0.075	---	0.010	0.005	0.006	0.096

TTHQ (Total Target Hazard Quotient)

DISCUSSION

It is known that aflatoxin, which is commonly found in herbal products, also poses a great risk for spices. The main reasons for this are that spices are mostly produced in tropical climates with high temperature and humidity, have traditional processing technologies, and are stored under inappropriate conditions (Salari et al., 2012).

In the Turkish Food Codex Contaminants Regulation prepared in accordance with the European Union Commission Regulation on Determination of the Maximum Limits of Certain Contaminants in Foods numbered 1881/2006/EC, red pepper (*Capsicum* spp.) (including their dried fruits, whole and ground forms) and black pepper (*Piper* spp.) (including their fruits, white pepper and black pepper), the maximum AFB₁ limit is 5 µg/kg, and the AFB₁+B₂+G₁+G₂ limit is 10 µg/kg (Anonymous, 2011).

In this study, the amount of AFB₁ above the permissible limit value in the Turkish Food Codex (5 ppb) was detected in 90% (18 samples) of the red pepper samples. In this study, the fact that the red pepper samples contain aflatoxin B₁ can be accepted as an indication that the production, harvest, drying and storage conditions are not made in accordance with hygienic rules or that the spice offered for sale openly and kept in inappropriate storage conditions is contaminated with mold spores. In a similar study, it was determined that all of the samples of red pepper samples sold without packages in Van were contaminated with AFB₁ at different levels (1.10-44.00 ppb). The amount of AFB₁ was found to be above the limit value (5 ppb) in 57.5% (23 samples) and at the limit value in 7.5% (3 samples) of the red pepper samples, (Agaoglu, 1999).

Among the spices, there are many studies showing that red pepper is the most sensitive product to aflatoxin. In studies conducted in different regions of Turkey, results were obtained confirming the risk of aflatoxin in red peppers. In a study, it was determined that all 30 red pepper samples and 90% of 15 chili pepper samples were contaminated with aflatoxin, 27% of red peppers and 63% of chili peppers exceeded the permissible limit of 10 ppb total aflatoxin (Bircan, 2005). Aflatoxin analysis was performed in 50 red pepper samples collected from the market in Kayseri and AFB₁ was detected between 1.48-70.05 ppb in all of them, 6% of which was above 5 ppb (Kanbur et al., 2006). It was determined that 68 of 100 red pepper samples collected from retail outlets in Istanbul were contaminated with AFB₁ at the level of 0.025-40.9 ppb (Aydin et al., 2007). According to the results of aflatoxin analysis performed by TLC in 49 red pepper samples collected from different cities of Turkey, AFB₁ at the level of 3.5-80 ppb in 24.5%, AFB₂ at the level of 3-60 ppb in 22%, and AFG₁ in the level of 8-40 ppb in 10% were detected in red peppers. 20 ppb of AFG₂ was found in only one

sample (Demircioglu & Filazi, 2010). Ozbey and Kabak (2012) examined a total of 105 spice samples, consisting of chili pepper, red pepper, black pepper, cumin and cinnamon, obtained from the market in Ankara and Çorum, in terms of aflatoxin. At the end of the study, AFB₁ was detected between 0.20-35.77 ppb in 63.9% of 22 red pepper samples. Golge et al. (2013) detected aflatoxin in 150 (82.4%) of 182 red pepper samples collected from the market in Adana and Osmaniye provinces in Turkey. While AFB₁ between 0.24-165 ppb was detected in 150 of 150 aflatoxin positive samples, AFB₂ between 0.15-11.3 ppb in 84, AFG₁ between 0.15-3.88 ppb in 32 samples, AFG₂ was not found in any sample.

In addition, studies conducted abroad have revealed the importance of mold contamination and aflatoxin problem in both spices and red peppers. It was determined that 67% of the 86 samples obtained from the market in Sri Lanka and 31% of the samples obtained from the market in Belgium contained AFB₁ over 5 ppb (Yogendrarajah et al., 2014). It has been determined that 95% of the red pepper samples obtained from the market in different regions of Morocco contain AFB₁ between 1.1-15.4 ppb (El Mahgubi et al., 2013). Aflatoxin was detected in 56% of powdered red peppers, 59% of red peppers collected from markets, 58% of powdered red peppers and 54% of red peppers collected from restaurants in Pakistan. The amount of AFB₁ was over 10 ppb in approximately 38% of the powdered red pepper samples and in approximately 30% of the red pepper samples (Iqbal et al., 2013).

In other studies (Agaoglu, 1999; Aydın et al., 2007; Ozbey ve Kabak, 2012), the amount of AFB₁ in red pepper samples are similar to the values obtained in this study. However, the level of AFB₁ reported by Bircan (2005), Demircioglu & Filazi (2010) and Golge et al. (2013) is much higher than the value in this study. Also, the results of AFB₁ obtained by Kanbur et al. (2006), El Mahgubi et al. (2013) is much lower than our results. AFB₂ levels determined in this study is much lower than determined by Demircioglu & Filazi (2010) and Golge et al. (2013). The differences in the results are thought to be because of climatic and regional factors besides the red pepper type and manufacturing processing.

In most of the health problems caused by heavy metals, treatment options are limited and sequelae or death can be observed frequently. This suggests that primary prevention measures may be more successful than secondary and tertiary treatment services. The main purpose in primary prevention is to prevent the contact of living things with heavy metal, which is risky for their lives. In this study, red pepper with the highest aflatoxin contamination was determined as the spice with the lowest heavy metal load in terms of Cd, Pb and Al, excluding Ni (Table 2). On the other hand, cumin is the spices with the highest value in terms of Ni, As and Al, and black

pepper in terms of Cd and Pb. The Cd level in black pepper samples and Ni levels in all spice samples determined in this study were above the limit values according to the Maximum permissible limit determined by WHO/FAO (2007). Nickel is emitted into the atmosphere by the combustion of nickel fuels, mining and refining processes, and ashing of urban wastes. In addition, sewage sludge is found in mixed soil and cigarettes (Unal, 2019). So, the reason for the high Ni level in all spices in this study may be the increase in Ni level in the soil due to industrialization, waste and sewage sludge. Cd element, which has a very high rate of transfer from soil to plant and is quite mobile in the soil, can be easily taken up by plants even at very low concentrations, especially in zinc deficiency, and accumulate in the edible parts of the plant. Cadmium, which passes into soil and water through industrial waste and residues, phosphorus fertilizers, pesticides, pollutes water and soil. Cadmium accumulates in the roots of some vegetables and fruits because the roots take heavy metals from the soil (Kahvecioğlu et al., 2008). Therefore, high cadmium levels may have been detected in black pepper samples.

Nkansah and Amoako (2010) determined the lead level as 0.1153-0.0973 g/kg and the Ni level as 0.0735-0.0593 g/kg in some spice samples collected in the city of Kumasi. In some samples, especially ginger, black pepper and cinnamon, the lead level was found to be higher than the limits determined by WHO/FAO. Dogan et al. (2014) determined the Ni level was 0.77-15.6 ppm, the Cd level was 0.001-0.24 ppm, the As level was 0.005-0.12 ppm, the Pb level was 0-0.68 ppm in the samples they took from 11 different factories producing red pepper flakes in Turkey. Soliman (2015) examined arsenic levels in 8 different spice samples collected from local markets in Egypt and determined the arsenic level as 0.02-0.11 ppm. Inam et al. (2013) investigated the Pb, Cd, As and Ni contents of five of the most widely used spices in Nagpur and found that the Pb level was 3.3-4.59 ppm, the Cd level was 0.04-0.4 ppm, the As level was 0.7-1.5 ppm and the Ni level was in the range of 2.82-5.76 ppm range. Pb and Ni levels determined in spices by Nkansah and Amoako (2010) and Pb and As levels determined by Inam et al. (2013) were higher than the levels determined in this study, Ni, Cd, As and Pb levels determined in red pepper by Dogan et al. (2014) were close to the levels determined in this study. Also, the Cd level detected in spices by Inam et al. (2013) was lower than the Cd level determined in this study.

EDI (Table 3), THQ and HI (Table 4) calculations were made in order to evaluate possible health risks arising from spice consumption. EDI values were compared with PTDI values. It has been determined that the calculated EDI values were below the limits in terms of Ni, As and Cd elements and that these metals do not pose any risk in terms of daily intake

tolerance limits in spice consumption. However, Al levels in all spice samples and Pb level in black pepper were above the limits. For this reason, this spices threaten the public health of consumers in terms of Al and Pb. Therefore all spice samples have the risk of acute toxicity in terms of Al and black pepper samples in terms of Pb levels if they are consumed continuously (Table 4). Although it does not directly and precisely reveal the possible health risks of consumers in case of exposure to metal pollutants, the THQ value is an important parameter in order to determine the potential health risks. $THQ > 1$; reveals that metal consumption poses a risk for the consumer. Among the THQ levels calculated using the amounts of metals measured in spices, the highest values were found in Ni. However, it was determined that the THQ values of all the metals examined were below the dangerous threshold (< 1). The HI values were also lower than 1 (Table 5).

CONCLUSION

There is a high risk of contamination by pathogenic bacteria in spices that are kept under inappropriate storage conditions, which are offered for sale openly. Since red pepper is used in a substantial amount during consumption, even the smallest amount of toxin that can be taken into the body harms the image of safe food and carries a great risk for the consumer. Farmers dealing with red pepper production in Turkey need to be more careful in collecting the product, especially at harvest time, and raise awareness about drying and storage conditions, production and packaging techniques. As a result of this study, it was concluded that as many samples as possible should be taken from the red peppers to be consumed and should be offered for consumption after periodic residue analyzes in terms of aflatoxins.

In this study, according to the Maximum permissible limit determined by WHO/FAO, the Cd levels detected in black pepper and the Ni levels in all spice samples in this study were above the limit values. This situation poses a risk to public health. Regular analysis of more food types in the future will protect society from potential health risks. Also, in terms of risk assessment, Al levels in all samples and Pb levels in black pepper exceeds the daily tolerable limits. But, spice samples do not pose a significant risk of non-carcinogenic effects, as THQ exposure values are less than 1. The fact that the HI values were also lower than 1 showed that the consumption of these spices did not cause excessive exposure to these chemicals.

Acknowledgement

I would like to thank Gülümser ÇAĞLI for supporting the laboratory studies.

Conflict of Interest

The author declares no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Author Contributions

Plan, design: UMY; **Material, methods and data collections:** UMY; **Data analysis and comments:** UMY; **Writing and corrections:** UMY.

Funding

This research was supported by Van Yüzüncü Yıl University Scientific Research Projects Unit (TYL-2017-5892).

REFERENCES

- Agaoglu, S. (1999). Investigation of the incidence of aflatoxin B1 existence in crushed red peppers sold unpacked in Van. *Van Medical Journal*, 6(4), 28-30.
- Allen, S. E. (1986). Chemical analysis. In: Moore PD, Chapman SB, editors. *Methods in plant ecology*. Oxford, London: Blackwell Scientific Publication, Pp. 285-344.
- Anonymous (2011). Turkish Food Codex Regulation on Contaminants, Upper Limits Allowed for Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>.
- Anonymous, (2022). IPCS INCHEM. 658. Arsenic. (WHO Food Additives Series 24). <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmon/o/v024je08.htm>. Access Date: 28.07.2022.
- AOAC (2000). Aflatoxin Extraction Method; Application Note for Analysis in Hazelnuts Using Aflaprep. Rhone-Diognostics Thecnologies Instructions; Arlington, VA, 999.07.
- Asomugha, R. N., Udowelle, N. A., Offor, S. J., Njoku, C. J., Ofoma, I. V., Chukwuogor, C. C., & Orisakwe, O. E. (2016). Heavy metals hazards from Nigerian spices. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 67(3), 309-314. *PMID: 27546329*.
- Aydin, A., Erkan, M. E., Baskaya, R., & Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B₁ levels in powdered red pepper. *Food Control*, 18, 1015-1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.03.013>
- Bircan, C. (2005). The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 929-934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01025.x>
- Castro-González, M. I. & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(3), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.06.001>
- Demircioglu, S., & Filazi, A. (2010). Investigation of Aflatoxin Residues in Red Peppers Produced in Turkey. *Journal of the Veterinary Medical Association*, 81(2), 63-66.
- Dogan, M., Saçmaci, Ş., Kalkan, G., Kartal, Ş. (2014). Determination of Some Heavy Metal Concentration Levels in Red Chilli Powder Samples, III. Artwork Analysis Workshop, 15-18 May, Gaziosmanpaşa University, Tokat.
- El Mahgubi, A., Puel, O., Bailly, S., Tadriss, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I. P., & Bailly, J. D. (2013). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*, 32, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013>
- EPA, U. S. (2016). Integrated Risk Information System. Erişim adresi: <https://www.epa.gov/iris/> EPA, U.S. (2019). Regional screening levels (RSLs) equations. <https://www.epa.gov/risk/regional-screeninglevels-rsls-equations>.
- Freedman, B. (1995). *Environmental Ecology, The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Other Stresses*, Academic Press.
- Gecan, J. S., Bandler, R., Glaze, L. E., & Atkinson, J. C. (1986). Microanalytical quality of ground and unground marjoram, sage and thyme, ground allspice, black pepper and paprika. *Journal of Food Protection*, 49(3), 216-221. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.3.216>
- Golge, O., Hepsag, F., & Kabak, B. (2013). Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. *Food Control*, 33, 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.048>
- Hazir, Z., & Coksoyler N, (1998). Aflatoxin levels in red peppers obtained in different regions and by different methods, *Food Engineering Congress and Exhibition*, 479-483. 16-18 September, Gaziantep-Turkey.
- Inam, F., Deo, S., & Narkhede, N. (2013). Analysis of minerals and heavy metals in some spices collected from local market. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8 (2), 40-43. <https://doi.org/10.9790/3008-0824043>.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Zuber, M., Akhtar, J., & Saif, M.J. (2013). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples. *Food Control*, 30, 621-625. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.003>
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1), 167-82. <https://doi.org/10.1093/bmb/1de032>
- JECFA (2011). Summary and conclusions of the seventy-fourth meeting, Rome, 14-23 June 2011, JECFA/74/SC.
- Kahvecioğlu O, Kartal G, Guven A, Timur S. Environmental effects of metals-I. ITU Metallurgical and Materials Engineering Department Lecture Notes, 2008.
- Kanbur, M., Liman, B. C., Eraslan, G., Altinordulu, S. (2006). Quantitative analysis of red peppers for consumption in Kayseri by enzyme Immunoassay (EIA). *Journal of Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine*, 3(1), 21-24.

- Mohammadi, A., Zarei, A., Majidi, S., Ghaderpoury, A., Hashempour, Y., Saghi, M., Alinejad, A., Yousefih, M., Hosseingholizadehi, N., & Ghaderpoori, M. (2019). Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of heavy metals in drinking water of Khorramabad, Iran. *MethodsX*, 6, 1642-1651. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.017>
- Nkansah, M. A., & Amoako, C. O. (2010). Heavy metal content of some common spices available in markets in the Kumasi metropolis of Ghana. *American Journal of Scientific and Industrial Research*, 1(2), 158-63. <http://dx.doi.org/10.5251/ajsir.2010.1.2.158.163>
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M. & Pehlivan, M (2009). Effects of heavy metals on plants. *Alinteri*, 17 (B), 14-26.
- Ozbey, F., & Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, 28, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.039>
- Salari R, Habibi Najafi MB, Boroushaki MT, Mortazavi SA, & Najafi MF (2012). Assessment of the microbiological quality and mycotoxin contamination of Iranian red pepper spice. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 1511-1521.
- Soliman Naglaa, F. E. (2015). Metals contents in spices and herbs available on the Egyptian market: assessment of potential human health risk. *The Open Conference Proceedings Journal*, 6, 24-29. <https://doi.org/10.2174/2210289201506010024>
- Traina, A., Bono, G., Bonsignore, M., Falco, F., Giuga, M., Quinci, E. M., ... & Sprovieri, M. (2019). Heavy metals concentrations in some commercially key species from Sicilian coasts (Mediterranean Sea): Potential human health risk estimation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 466-478. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.056>
- Unal, B., Yilmaz, U. G., Gokoglu, M. & Ozvarol, Y. (2019). Determination of the Biological Characteristics and Heavy Metal Levels (Pb, Cd, Hg, Cu, Zn, Co, Ni) of the Fossil Mussel (*Lithophaga lithophaga* L. 1758) (Meat, Shell, Rock) Showing the Distribution in the Antalya Gulf. *Bilim Armonisi*, 2 (1) , 33-47 .
- Uner, Y., Aksu, H., & Ergun, Ö. (2000). Effects of spice on various microorganisms. *Journal of Istanbul University Faculty of Veterinary Medicine*, 26 (1), 1-10.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2019). Regional screening levels (RSLs) – equations. <https://www.epa.gov/risk/regional-screening-levels-rsls-equations>.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (2000). Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories, Volume II. Risk Assessment and Fish Consumption Limits. EPA 823-B-00-008. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Williams, J.H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggerwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- WHO (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva.
- WHO/FAO (2011). Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Foods. Fifth Session Codex Alimentarius Commission, The Hague, The Netherlands.
- Yogendrarajah, P., Jacxsens, L., De Saeger, S., & De Meulenaer, B. (2014). Cooccurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, 46, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.043>



ORİJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg

Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J

ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238

Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1160570>



Karadeniz Suyunda Yetişen Kalkan (*Psetta maxima*) Balıklarında Florfenikol'ün Farmakokinetiğinin Belirlenmesi

Erkan TAÇBAŞ¹, Emine BAYDAN², Mustafa TÜRE³, İlyas KUTLU³, Cemil ALTUNTAŞ³, Gözde Yücel TENKEKİ⁴, Farah Gönül AYDIN², Emre ARSLANBAŞ⁵

¹ Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı Gıda ve Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı.

² Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.

³ Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.

⁴ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı.

⁵ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.

Geliş Tarihi / Received: 11.08.2022, **Kabul Tarihi / Accepted:** 28.09.2022

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Karadeniz Kalkan Balığında (*Psetta maxima*) tek doz (10 mg kg⁻¹) florfenikolün (FF) farmakokinetiğinin belirlenmesi amaçlandı. **Gereç ve Yöntem:** Çalışma Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde bulunan kapalı sistem havuzlarda Karadeniz suyunda (sıcaklık 11±1°C, tuzluluk oranı %0.18, oksijen miktarı 10.02 mg ml⁻¹ altına düşürülmedi) gerçekleştirildi. Deneyler validasyon (5 adet) ve ilaç denemeleri (60 adet) dahil 65 adet kalkan balığında (42±2 gr) gerçekleştirildi. Kalkan balıkları kas içi ve gavaj yoluyla FF uygulanan gruplar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Plazma FF düzeylerinin belirlenmesi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazında (HPLC) gerçekleştirildi. Farmakokinetik analizler kompartımanlı olmayan modele göre win-nonlin farmakokinetik program kullanılarak yapıldı. **Bulgular:** Validasyon çalışma sonuçları Göreceli standart sapma (RSD) (%), ortalama geri kazanım (%), LOD ve LOQ (ppm) değerleri üzerinden sırasıyla, %96.19, %85.81±0.026, 0.0039 ve 0.012 ppm olarak belirlendi. Kas içi ve gavaj yoluyla FF uygulama gruplarının Tmax, Cmax, T1/2, Clast, AUClast, Vz_F_obs, Cl_F_obs değerleri sırasıyla 1 ve 6 saat; 6.60 ve 5.17 mg L⁻¹; 48 ve 48 saat; 2.02 ve 1.48 mg L⁻¹; 145.39 ve 101.76 saat mg L⁻¹; 2.54 ve 3.64 L kg⁻¹; 0.033 ve 0.045 L kg saat⁻¹ olarak belirlendi. **Sonuç:** Araştırma sonuçları FF farmakokinetiğinin balık türü ve yetiştirme koşulları ile ilgili su sıcaklığı, tuzluluk oranı gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Farmakokinetik, Florfenikol, Kalkan, Karadeniz, Kas İçi, Mide İçi (Gavaj).

Determination of the Pharmacokinetics of Florfenicol in Turbot (*Psetta maxima*) Fish Grown in Black Sea Water

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to determine the pharmacokinetics of florfenicol (FF) in a single dose (10 mg kg⁻¹) in Black Sea Turbot (*Psetta maxima*). **Materials and Methods:** The study was carried out in closed system pools within the Trabzon Fisheries Central Research Institute in Black Sea water (temperature was 11±1°C, the salinity rate was 0.18 %, oxygen did not fall below 10.02 mg ml⁻¹). Experiments were performed on 65 turbot fish (42±2 g) including validation (5 specimens) and drug trials (60 specimens). Turbot fish were divided into two groups as FF administered intramuscularly and gavage. Determination of plasma FF levels was performed on a high pressure liquid chromatography device (HPLC). Pharmacokinetic analyzes were performed using the win-nonlin pharmacokinetic program according to the non-compartmental model. **Results:** The results of the validation studies were determined as 96.19, 85.81±0.026, 0.0039 and 0.012 based on Relative Standard Deviation (RSD) %, mean recovery %, LOD and LOQ in ppm, respectively. Tmax, Cmax, T1/2, Clast, AUClast, Vz_F_obs and Cl_F_obs values of intramuscular and gavage FF administration groups are respectively; 1 and 6 hour; 6.60 and 5.17 mg L⁻¹; 48 and 48 hour; 2.02 and 1.48 mg L⁻¹; 145.39 and 101.76 hour mg L⁻¹; 2.54 and 3.64 L kg⁻¹; 0.033 and 0.045 L kg h⁻¹. **Conclusion:** The results of the study showed that the pharmacokinetics of FF may vary depending on the fish species and growing conditions, such as water temperature, salinity.

Keywords: Pharmacokinetics, Florfenicol, Turbot, Black Sea, Intramuscular, Intra-gastric (Gavage).

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Emre ARSLANBAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

E-mail: emre.arslanbas@atauni.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Taçbaş, E., Baydan, E., Türe, M., Kutlu, İ., Altuntaş, C., Tenekeci, G.Y., Aydın, F.G., & Arslanbaş, E. (2022). Karadeniz suyunda yetişen kalkan (*psetta maxima*) balıklarında florfenikol'ün farmakokinetiğinin belirlenmesi. *BAUN Sağ Bil Derg*, 11(Supplement 1): 15-21.

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1160570>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Kalkan (*Psetta maxima*), Scophthalmidae ailesinin bir üyesidir (Aydın ve Şahin, 2011). Kalkan balığı Türkiye su ürünleri arasında önemli bir ticari ve besinsel değere sahip yassı balık türlerinden biridir (Aydın ve ark., 2020; Aydın ve Şahin, 2011; Samsun ve ark., 2007). Kalkanlar, Atlantik, Baltık Denizi, Akdeniz ve Karadeniz'in Avrupa kıyı sularında bulunur (Aydın ve ark., 2019). Kalkan yetiştiriciliği 1997 yılında Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Japonya Uluslararası İş birliği Ajansı (Japan International Cooperation Agency-JICA) ortaklığında "Karadeniz Kalkanı Avlama Tekniklerinin Geliştirilmesi" projesi ile başlamıştır (Aydın ve ark., 2020). Akdeniz Genel Balıkçılık Komisyonu, FAO ve Merkezi Balıkçılık Araştırma Enstitüsü (Central Fisheries Research Institute-CFRI) işbirlikliği ile Karadeniz Kalkanı'nın üreme mevsimine denk gelen 14-23 Mayıs 2018 tarihlerinde Trabzon'da düzenlenen eğitim toplantısında Kalkan yetiştiriciliğine odaklanılmıştır (Caruso ve ark., 2018).

Balıklarda stres faktörleri immun baskılanma ile bakteriyel ve paraziter hastalıkların gelişmesine neden olur. Türkiye'de 1976-2013 yılları arasındaki yayımlanmış kaynaklardan elde edilen bilgilere göre kalkanlarda bakteriyel ve viral hastalıklardan Vibriosis, Frunculosis (*A. salmonicida*), Flexibacteriosis (*Tenacibaculum maritimum*, önceleri *Flexibacter maritimus*), Coccal Infections (*Lactococcus garvieae*, önceleri *Enterococcus seriolocida*), *Serratia liquefaciens* Infection ve Viral hemorrhagic septicemia (VHS) kaydedilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006; Öztürk ve Altınok, 2014). Balık çiftliklerindeki büyük üretim kayıplarına genellikle bakteriyel enfeksiyonlar neden olur. Balıklar poikiloterm canlılardır ve ilaçların farmakokinetiği diğer türlere ve yaşam koşullarına göre balıklarda önemli derecede farklılık gösterir. Bu nedenle, etkili tedavide gereken optimal dozu belirlemek için farmakokinetik çalışmaların hedef balık türünde yapılması gerekir (Ocenda ve ark., 2017).

Antibakteriyel bir ilaç olan florfenikol (FF), sentetik bir amfenikoldür ve kemik iliği baskılanması açısından kloramfenikole göre daha güvenlidir (Kogiannou ve ark., 2020; Lis ve ark., 2011). FF balıklarda çeşitli bakterilere karşı etkili bulunmuş olmakla birlikte, kalkanlarda farmakokinetikleri üzerine çalışmalar sınırlıdır (Ocenda ve ark., 2017).

Bu çalışmada, Türkiye'de Karadeniz suyu koşullarında yetiştirilen kalkanlarda kas içi ve gavajla mideye uygulanan FF'nin farmakokinetiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Florfenikol analitik standart Fluka'dan, FF teknik standart (%99.2, Anhui Liberty Pharmaceutical) bir

Türk veteriner ilaç firmasından temin edildi. Asetonitril, metanol, etil asetat ve diğer HPLC saflıktaki kimyasallar Merck Company'den satın alındı.

Deney yeri ve koşulları

Çalışma, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde bulunan kapalı sistem havuzlarda Karadeniz suyunda gerçekleştirildi. Karadeniz suyu sıcaklığı deneme boyunca $11 \pm 1^\circ\text{C}$, tuzluluk oranı %0.18, suyun debisi 1 litre dakika⁻¹ değerlerinde tutuldu. Günlük su değişimi 15 kez olarak yapıldı. Oksijen miktarı 10.02 mg ml⁻¹'ye ayarlandı. Kalkan balıklarının temin edildiği sürüden rutin muayene kapsamında 5 balıkta bakteriyel ve paraziter inceleme yapıldı. Bakteriyel muayene için balıkların karaciğer ve böbrekleri Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) ve Tiyosülfat-sitrat-safra tuzları-sükroz agar (TCBC, Merck)'de inoküle edildi ve 25°C 'de üç gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petri kabı koloni oluşumu için gözlemlendi. Parazit incelemesi için deri ve solungaç kazıma yoluyla örnekler hazırlandı. Örnekler mikroskopik olarak X20 ve X40 büyütmede incelendi (Türe ve ark., 2014). Deneylerde etik izin alınan (Etik no: 42208298-040-04-02) 65 adet kalkan balığı (42 ± 2 gr) kullanıldı.

HPLC cihazı çalışma koşulları

Schimadzu Model 20-AT prominence

Photo Diode Array Dedektör

Mobil faz (725ml ultra saf su, 265ml asetonitril, 4ml %10'luk asetik asit)

Kolon sıcaklığı 25°C

Kolon (C 18)

Akış hızı 0.8ml dakika⁻¹

Dalga boyu 223nm

Süre 30dk

Validasyon çalışmaları ve plazma FF analizi

Metot validasyon çalışmaları için 5 adet kalkan balığı kullanıldı. Validasyon çalışmalarında, FF stok ve çalışma standart çözeltileri Van de Riet ve arkadaşları (2003)'nın yöntemi esas alınarak hazırlandı. FF saf standart (Fluka) ile $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonda ana stok çözeltisi metanol: ultra saf suda (v/v; 3:7) çözdürülerek hazırlandı. Ana stoktan ileri dilüsyonlar ($0.375, 0.75, 1.5, 3$ ve $6 \mu\text{g ml}^{-1}$) %0.1 asetik asit çözeltisi kullanılarak yapıldı. Hazırlanan standartlar $20 \mu\text{l}$ hacimde HPLC cihazına uygulandı. Ölçümler en az 5 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçların ortalaması alınarak kalibrasyon eğrisi çizildi (Taçbaşı, 2018). Validasyon Doğrusallık (Linearity; 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarda, her doz için 3 tekrar), Seçicilik (Selectivity; balık türüne ve matrikse bağımlı olarak 5 farklı kör ve 3 farklı konsantrasyonda bakıldı), Doğruluk (Accuracy) ve Kesinlik (Precision), Tekrar Üretilbilirlik (Reproducibility; farklı günlerde 0.75, 1.5 ve 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dozlarda üç tekrar olarak) ve Duyarlılık (Sensitivity) parametreleri üzerinden yapıldı. Plazmadan FF analizi için 0.5ml kan plazması alınarak %0.1 asetik asitle hacim, cam tüpte 1ml'ye tamamlandı. Üzerine 1ml 0.1M fosfatlı tampon çözeltisi (pH:7) eklendi. Bunun da üzerine 4ml etil

asetat eklendi. 10 dakika boyunca yüksek hızda çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra üstteki 3ml hacimdeki süpernatant başka bir cam tüpe ayrıldı. Geri kalan kısmın üzerine 2ml daha etil asetat eklenerek işlemler tekrarlandı. 2ml hacimdeki süpernatant alınarak daha önceden ayrılmış olan süpernatanta eklendi. Cam tüpteki 5ml etil asetat 40°C azot evaporatörde uçuruldu. Üzerine 1ml mobil faz (725ml ultra saf su, 265ml asetonitril, 4ml %10'luk asetik asit) eklenerek çözdürüldü (Anadón ve ark., 2008; Taçbaşı, 2018; Van de Riet ve ark., 2003).

Hayvan deneyleri

Araştırmada 60 adet kalkan balığı kullanıldı. Kalkan balıkları kas içi (n:30) ve gastrik gavaj (n:30) grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. İlaç deneme grubundaki balık sayısı her zaman diliminde 5 balıktan ve her balıktan da sadece bir kez kan alınacak şekilde belirlendi.

İlaç deneme gruplarına uygulanacak FF teknik standarttan %100'e tekabül edecek şekilde tartım yapılarak dimetil formamid (2ml) ve fizyolojik tuzlu su (8ml) yardımıyla önce ana stok (100 mg ml⁻¹), bundan da tekrar dilüsyonla 10 mg ml⁻¹'lik uygulama çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden balıklara 10 mg kg⁻¹ c.a FF doz hesabıyla 42 mikrolitre hacimde olacak şekilde gavaj ve kas içi yolla uygulama yapıldı.

Grup 1 ve 2'de bulunan balıklardan 1., 3., 6., 12., 24. ve 48., saat dilimlerinde lityum heparinli tüplere kuyruk venasından yaklaşık 2 ml kan alındı ve en kısa sürede 3000 dev dakikada⁻¹ 10 dakika santrifüj ile plazmalar elde edildi. Numaralanmış plazma örnekleri analizlere kadar -18°C'de saklandı.

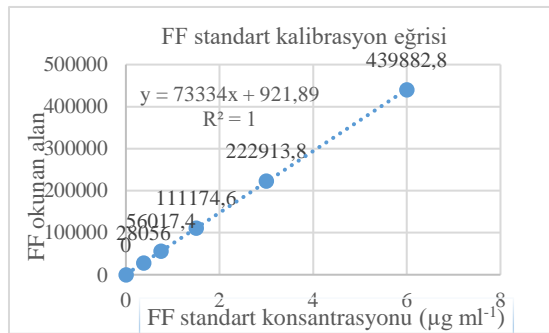
Farmakokinetik hesaplamalar

Farmakokinetik analiz, win-nonline programı (Version 5.2, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) kullanılarak kompartimentsız modele göre yapıldı. İlaç deneme gruplarında her zaman dilimindeki ortalama plazma FF düzeyi cihazın LOD üstü belirlediği değerlerin ortalaması alınarak hesaplandı.

BULGULAR

Validasyon parametre sonuçları

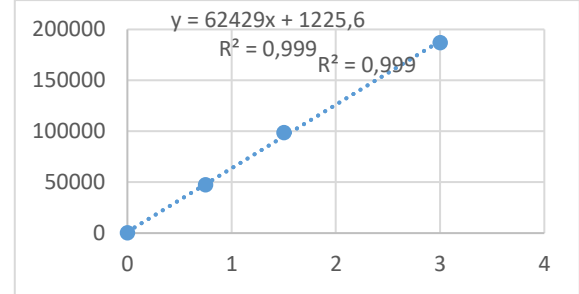
Metot validasyon sonuçları Tablo 1, 2, 3, 4 ve Şekil 1, 2 ve 3'de verilmiştir.



Şekil 1. FF standart kalibrasyon eğrisi (n=5, her konsantrasyon için)

Tablo 1. Kalkan balığı plazmasında üç farklı konsantrasyonda FF için Doğrusallık sonucu.

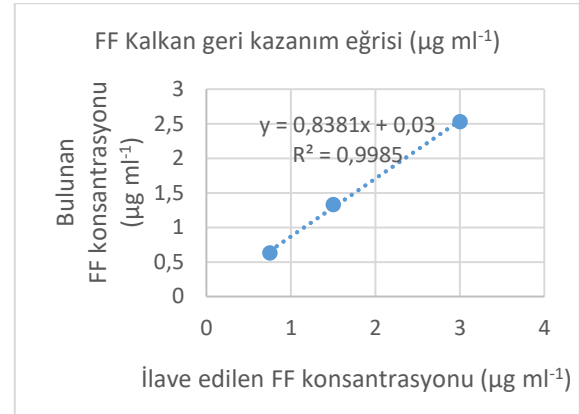
Regresyon formülü	R ²
$y = 62429x + 1225.6$	0.999



Şekil 2. Kalkan balığı doğrusallık eğrisi

Tablo 2. Kalkan balığı plazmasında FF için geri kazanım sonuçları.

FF (µg ml ⁻¹)	Ortalama Geri kazanım (µg ml ⁻¹) (n=3)	Geri kazanım (%)	RSD (%)
0.75	0.63±0.04	84.11	6.45
1.5	1.33±0.004	88.81	0.35
3	2.53±0.03	84.51	1.38



Şekil 3. Kalkan balığı plazmasında FF geri kazanım eğrisi (n=3, her konsantrasyon için)

Tablo 3. Kalkan balığı plazmasında FF için Tekrar üretilebilirlik sonuçları.

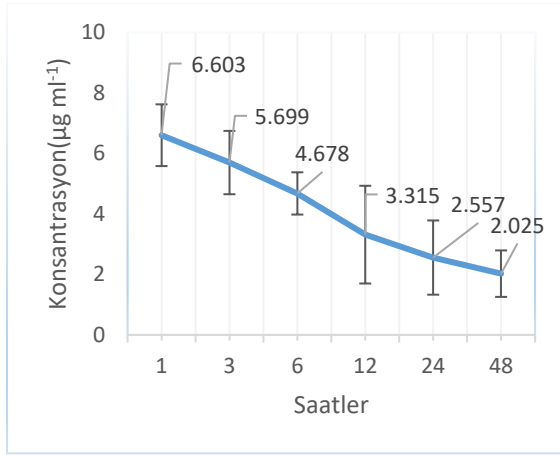
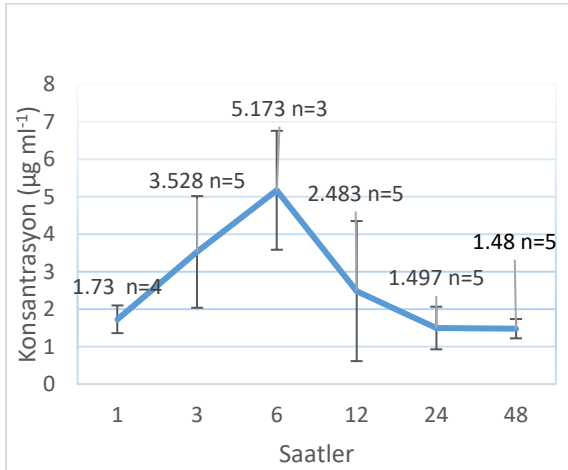
FF (µg ml ⁻¹)	Göreceli standart sapma RSD (%)
0.75	3.4
1.5	0.05
3	0.0004

Tablo 4. Kalkan balığı plazmasında FF için Duyarlılık (tespit ve tayin limitleri) sonuçları.

Florfenikol	Kalkan plazma	
	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.0039
LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.0120	

İlaç deneme grupları (kas içi ve gavaj) plazma FF sonuçları

İlaç deneme grupları plazma FF sonuçları Şekil 4 ve 5'de, farmakokinetik parametre analiz sonuçları ise Tablo 5'de verildi.

**Şekil 4. Kalkan balıklarında kas içi 10 mg kg^{-1} uygulanan FF'ye ait ortalama plazma konsantrasyon-zaman eğrisi ($n=5$, her zaman dilimi için).****Şekil 5. Kalkan balıklarında gavajla 10 mg kg^{-1} uygulanan FF'ye ait ortalama plazma konsantrasyon-zaman eğrisi ($\mu\text{g ml}^{-1}$).****Tablo 5. Kalkan balıklarında kas içi ve gavaj yolla 10 mg kg^{-1} dozda uygulanan FF'ye ait farmakokinetik parametre sonuçları.**

	(İM)	(Gavaj)
Tmax (saat)	1	6
Cmax (mg L^{-1})	6.60	5.17
Tlast (saat)	48	48
Clast (mg L^{-1})	2.02	1.48
AUClast (saat mg L^{-1})	145.39	101.76
Vz_F_obs (L kg^{-1})	2.54	3.64
Cl_F_obs (L kg saat^{-1})	0.033	0.045
MRTlast (saat)	19.31	19.02
F (%) (Nispi biyoyararlanım)		%69.65

Tmax: Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi, Cmax: Maksimum konsantrasyon, Tlast: Son ölçülebilen konsantrasyon zamanı, Clast: Son ölçülebilen konsantrasyon, AUClast: Dozlama zamanından son ölçülebilen konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan, Vz_F_obs: Terminal fazda belirlenen dağılım hacmi, Cl_F_obs: Ekstravasküler uygulama için gözlenen toplam vücut klirensi, MRTlast: Dozlama zamanından ölçülebilen son konsantrasyona kadar olan ortalama kalış süresi.

TARTIŞMA

Validasyon parametre sonuçları (Tablo 1, 2, 3, 4 ve Şekil 1, 2, 3) HPLC yönteminin kalkan balığı plazmasında FF analizi için uygun olduğunu göstermiştir.

İlaçların farmakokinetiği, tür, birey ve ilaç gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir (Vinarov ve ark., 2021). Farklı balık türlerinde FF'nin farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen (Pourmolaie ve ark. 2018; Shiry ve ark., 2019; Wang ve ark., 2009; Yanong ve ark., 2005), kalkan balığında yapılmış sadece bir çalışma bulunmaktadır (Ocenda ve ark., 2017). Ancak, çalışılan kalkan balığı türü bu çalışmadakinden (*Psetta maxima*) farklı olarak *Scophthalmus maximus*'tur. Diğer yandan ilaç uygulama şekli de bu çalışmadakinden (kas içi ve gastrik gavaj) farklı olarak ilaçlı yem şeklindedir.

Mevcut çalışmada, *Psetta maxima*'da kas içi uygulanan FF'nin Tmax (saat) ve Cmax (mg L^{-1}) değerleri 1 ve 6.60, gavaj yolla uygulananda ise sırasıyla 6 ve 5.17 olarak bulundu. Bu durum intramüsküler uygulama ile ilacın gavajdan daha kısa sürede daha yüksek kan konsantrasyonlarına ulaştığını göstermektedir. Uygulama yoluna bağlı bu farklılık gavaj uygulamasında ilacın kas içi uygulamaya göre emilim bakımından biyolojik membranlardan geçmesi için zaman gerektirmesine, kas içi uygulamada ise ilacın uygulama yerindeki kapillar damarlar aracılığıyla kana daha kolay ulaşmasına bağlıdır. Deneysel hayvanlarındaki çalışmalar periton içi (ip) uygulamada olduğu gibi parenteral uygulamaların ağız yolu uygulamasına göre daha yüksek biyoyararlanıma

sahip olduğunu bunun da daha kısa t_{max} 'a ulaşma süresi gerektirdiğini bildirmektedir (Al Shoyaib ve ark., 2020).

Kas içi uygulamada C_{last} ($mg L^{-1}$) ve AUC_{last} (saat $mg L^{-1}$) değerleri gavaja göre daha yüksek olmasına rağmen, T_{last} (saat) değerleri esas alınan örnekleme zaman süreci itibarıyla her iki grupta da aynı (48) bulundu. FF'nin dağılım hacmi ($V_z F_{obs}$, $L kg^{-1}$) ise gavaj yolla verilen grupta daha büyük belirlendi. Bu durum gavaj yolla uygulanan ilacın doku ve organlara daha iyi dağıldığını göstermektedir. T_{last} (saat) değerinde olduğu gibi FF'nin MRT_{last} (saat) değeri de kas içi ve gavaj grubunda birbirine oldukça yakın bulundu (sırasıyla 19.31 ve 19.02). Nispi biyoyararlanım (%), T_{max} (saat), C_{max} ($mg L^{-1}$), AUC (saat $mg L^{-1}$), MRT (saat) ve klirens (L) değerleri bakımından Ocenda ve arkadaşlarının (2017) kalkanlarda yaptıkları FF farmakokinetik çalışmasındakine göre (sırasıyla 57.1, 13.8, 44.35, 2036.9, 30.2 ve 0.028) bu çalışmada FF'nin Nispi biyoyararlanımı daha yüksek (% 69.65), im ve gavaj her iki uygulama grubunda T_{max} daha kısa (sırasıyla 1 ve 6 saat), C_{max} (sırasıyla 6.60 ve 5.17 $mg L^{-1}$), AUC (sırasıyla 145.39 ve 104.76 saat $mg L^{-1}$) ve MRT (sırasıyla 19.31 ve 19.02 saat) değerleri daha düşük, klirens ise benzer sırasıyla 0.033 ve 0.045 $L kg^{-1}$ bulundu.

AUC vücudun bir ilaca maruz kalma derecesini ifade eder (Scheff, 2011). AUC , ilaç dozu ve uygulama sıklığı, yaş, cinsiyet, boy, kilo, birlikte kullanılan ilaçlar, ilaç metabolize edici enzimlerdeki kalıtsal varyasyonlar, ilaç taşıyıcıları ve/veya ilaç hedefleri, ilaç klirensi (böbrek ve karaciğer fonksiyonu) gibi hastaya özgü faktörlerden etkilenir (Eaton ve ark., 2018). Bu çalışmada Ocenda ve arkadaşları (2017)'na göre biyoyararlanım biraz daha yüksek, klirens benzer çıkmakla birlikte AUC değerindeki düşüklük uygulanan ilaç birim miktarının bu çalışmada Ocenda ve arkadaşları (2017)'ninkine göre ($100 mg kg^{-1}$ c.a. ağızdan) daha düşük ($10 mg kg^{-1}$ c.a. gastrik gavaj), balık canlı ağırlığının daha az ve kalkan balığı türünün farklı olmasıyla ilgili olabilir. İlacın doğrudan gastrik gavaj yoluyla verilmesiyle ilaçlı yem şeklinde verilmelere göre biyoyararlanımın (F) daha fazla olacağı literatür bilgisiyle örtüşerek (Turner ve ark., 2011) emilimin daha kısa sürede olmasına, dolayısıyla T_{max} süresinin daha kısa çıkmasına neden olmuştur. Ancak, Pourmolaie ve arkadaşları (2018) tarafından alabalıklarda yapılan çalışmada gavaj yola göre ilaçlı yem şeklinde verilen FF'nin C_{max} değerinin yüksek çıkması yem bileşimine ve bileşimin FF'nin emilmesini artırmasına bağlanmıştır. Bu çalışmada T_{max} daha kısa olmakla birlikte C_{max} değerinin Ocenda ve arkadaşları (2017)'ninkinden düşük çıkması Ocenda ve arkadaşları (2017)'ninkinde verilen dozun yüksekliği yanında yem bileşiminin de FF'nin emilen miktarını artırmasıyla ilgili olabilir. Diğer yandan su canlılarında yapılan çalışmalar su sıcaklığının ilaç etken maddesinin biyotransformasyonunun değişmesinde önemli etken olduğunu göstermektedir (Cervený ve ark., 2021). FF ile ilgili Nil tilapia

(*Oreochromis niloticus*)'larında yapılan çalışmada su sıcaklığının $24^{\circ}C$ 'den $32^{\circ}C$ 'ye çıkmasının eliminasyon hız sabitinin artmasına, eliminasyon yarı ömrünün kısalmasına, emilim yarı ömrünün düşmesine, maksimum serum konsantrasyonunun düşmesi ve bu konsantrasyona ulaşmak için geçen sürenin kısalmasına, AUC 'nin yarı yarıya düşmesine, dağılım hacminin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Rairat ve ark., 2019). Yine Rairat ve arkadaşları (2019) tarafından Nil tilapia (*Oreochromis niloticus*)'sında yapılan çalışmada da suyun tuzluluk oranı arttıkça iv uygulanan FF'nin eliminasyon yarı ömrünün kıaldığı, klirensinin arttığı, hızlı atılmaya bağlı olarak AUC değerinin düştüğü, ancak FF'nin ağızdan uygulandığı grupta yüksek tuzluluğa bağlı biyoyararlanımın artmasından dolayı AUC değerinde belirgin bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir. Diğer yandan oksitetrasiklin (OTC)'le ilgili yapılan bir çalışmada da suyun sıcaklığının artmasının AUC değerini düşürdüğü, fakat bunda daha çok ilacın özelliğine bağlı olarak katyonlarla kompleks oluşturmasının da etkili olabileceği bildirilmiştir (Rigos ve Smith, 2015). Mevcut çalışma sonuçlarının bu çalışma sonuçlarıyla örtüşmemesi kalkan balık türündeki biyolojik farklılık ve Karadeniz suyunun özellikleriyle (Karadeniz suyu sıcaklığının deneme boyunca 11 ± 1 santigrat, tuzluluk oranının %0.18, oksijen miktarının $10.02 mg ml^{-1}$) ilgili olabilir.

Balıklarda antibiyotiklerin, hatta genel anlamda ilaçların PK/PD'sine ve minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. FF'nin PK/PD'sine ve MIC değerlendirmesine ilişkin araştırmalar da oldukça azdır. Bu kapsamda Su ürünlerinde Epidemiyolojik cut-off (ECO) değerleri sadece *Aeromonas salmonicida* için belirlenmeye çalışılmış (Smith, 2007), *V. anguillarum* için sadece bir çalışma bulunmuştur (Smith ve Christofilogiannis, 2007). Nitekim Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin 2018 yılı listesinde de FF'nin ECO ve breakpoint verilerine ilişkin bilgi bulunamamıştır (CLSI, 2018). Ancak, sınırlı da olsa aynı antibiyotiğe yönelik balıklarda bir ECO değeri bulunduğu bunun antibiyotik tedavisine başlamada yardımcı olabileceği de bildirilmektedir.

Çeşitli balık türlerinden izole edilen balık patojenleri için FF'nin etkinlik çalışmalarında MIC değerleri etkenlere göre farklılık göstermekle birlikte *Aeromonas hydrophila* ($n=41$) için $0.78- >100 \mu g ml^{-1}$, *Edwardsiella tarda* ($n=76$) için $0.2- >100 \mu g ml^{-1}$, *Klebsiella spp.* ($n=21$) için $0.78-25 \mu g ml^{-1}$, *Pseudomonas fluorescences* ($n=32$) için $0.78- >100 \mu g ml^{-1}$, *Streptococcus spp.* ($n=12$) için $0.78- >100 \mu g ml^{-1}$, *Vibrio spp.* ($n=58$) için $0.78-50 \mu g ml^{-1}$ olarak değiştiği görülmektedir (Ho ve ark., 2000). Lin ve arkadaşları (2022) tarafından *Aeromonas spp.*'ne yönelik 8 antibiyotiğe ilişkin ECO çalışmasında da FF için değer $1 \mu g ml^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada MIC değerine bakılmamış olmakla birlikte, FF'nin diğer araştırmalardaki MIC değerleri (Ocenda ve ark.,

2017) ve en düşük MIC ilacın 48. saate kadar etkili olabileceği düşünülebilir. Ancak, daha kesin veriler elde etmek için mevcut koşullarda MIC değerlerinin araştırılması gerekmektedir.

SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, farmakokinetik parametre değerlerinin balığın türüne ve büyüme koşullarına göre değişebileceğini, bu nedenle özellikle balıklarda spesifik farmakokinetik çalışmaların yapılması gerektiğini göstermiştir.

Teşekkür

Farmakokinetik analizlere katkılarından dolayı Cengiz GÖKBULUT'a, çalışmamız için ortam ve destek sağlama Trabzon Merkez Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü yönetimine ve personeline teşekkür ederiz. Finansman: Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM / HSGYAD/15/A11/P03/65).

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayımlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: ET, EB; **Gereç ve yöntem ve veri toplama:** ET, EB, MT, İK, CA, GYT, FGA, EA; **Veri analizi ve yorum:** ET, EB, MT, İK, CA, GYT, FGA, EA; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** ET, EB, MT, İK, CA, GYT, FGA, EA.

KAYNAKLAR

Al Shoyaib, A., Archie, S.R., & Karamyan, V.T. (2020). Intraperitoneal route of drug administration: Should it be used in experimental animal studies? *Pharmaceutical research*, 37(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>.

Anadón, A., Martínez, M. A., Martínez, M., Ríos, A., Caballero, V., Ares, I., & Martínez- Larrañaga, M. R. (2008). Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 11049-11056. <https://doi.org/10.1021/jf802138y>.

Aydın, İ., & Şahin, T. (2011). Reproductive performance of turbot (*Psetta maxima*) in the southeastern Black Sea. *Turkish Journal of Zoology*, 35(1), 109-113. <https://doi.org/10.3906/zoo-0905-26>.

Aydın, İ., Polat, H., & Şahin, T. (2019). Reproductive Performance of Wild and Hatchery-Reared Black Sea Turbot, *Psetta maxima*, in the Southern Black Sea Coast. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(5), 351-357. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_03.

Aydın, İ., Polat, H., Küçük, E., & Özdemir, M. D. (2020). Turbot and flounder aquaculture. In: Marine Aquaculture in Turkey: Advancements and Management. Turkish Marine Research Foundation (TUDAV). Eds: Çoban, D., Demircan, M.D., Tosun, D.D. Publication No: 59, İstanbul, Turkey.

Caruso, F., Pierraccini, J., Bourdenet, D., & Massa, F. (2018). Technical Training on Turbot Farming and Restocking in Trabzon, Turkey. FAO Aquaculture Newsletter No. 59.

Cervený, D., Fick, J., Klaminder, J., McCallum, E.S., Bertram, M.G., Castillo, N.A., & Brodin, T. (2021). Water temperature affects the biotransformation and accumulation of a psychoactive pharmaceutical and its metabolite in aquatic organisms. *Environment International*, 155, 106705. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106705>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edition.

Eaton, K.D., & Lyman, G.H. (2018). Dosing of anticancer agents in adults. *UpToDate*, <https://www.uptodate.com/contents/dosing-of-anticancer-agents-in-adults> (accessed on 25 December, 2018).

Ho, S-P, Hsu, T-Y, Che, M-H, & Wang W-S. (2000). Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62(5), 479-485. <http://doi.org/10.1292/jvms.62.479>.

Kalayci, G., Incoglu, S., & Ozkan, B. (2006). First isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26(4), 157.

Kogiannou, D., Nikoloudaki, C., Katharios, P., Triga, A., & Rigos, G. (2020). Evaluation of absorption and depletion of florfenicol in European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 987-997. <http://doi.org/10.1002/vms3.415>.

Lin, Y., Yang, J., Wu, Z., Zhang, Q., Wang, S., Hao, J., Ouyang, L., & Li, A. (2022). Establishment of Epidemiological Resistance Cut-Off Values of Aquatic Aeromonas to Eight Antimicrobial Agents. *Microorganisms*, 10, 776. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040776>.

Lis, M., Szczyepka, M., Suszko, A., Światała, M., & Obmińska-Mrukowicz, B. (2011). The effects of florfenicol on lymphocyte subsets and humoral immune response in mice. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(2), 191-198. <http://doi.org/10.2478/v10181-011-0029-4>.

Ocenda, V-R de, Almeida-Prieto, S., Luzardo-Alvarez, A., Barja, J. L., Otero-Espinar, F.J., & Blanco-Mendez, J. (2017). Pharmacokinetic model of florfenicol in turbot (*Scophthalmus maximus*): Establishment of optimal dosage and administration in medicated feed. *Journal of Fish Diseases*, 40(3), 411-424. <http://doi.org/10.1111/jfd.12525>.

Öztürk, R. Ç., & Altınok, İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 275-297.

Pourmolaie, B., Eshraghi, H. R., Haghghi, M., Mortazavi, S. A., & Rohani, M. S. (2018). Pharmacokinetics of florfenicol by gavage feeding or medicated feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 7(1), 44-46.

Samsun, N., Yiğit, M., & Çolak, S. Ö. (2007). Türkiye'de kalkan balığı avcılığının durumu ve sorunları. *Su Ürünleri Mühendisleri Derneği Dergisi*, 31, 17-20.

- Scheff, J.D., Almon, R.R., DuBois, D.C., Jusko, W.J., & Androulakis, I. P. (2011). Assessment of pharmacologic area under the curve when baselines are variable. *Pharmaceutical research*, 28(5), 1081-1089. <http://doi.org/10.1007/s11095-010-0363-8>.
- Shiry, N., Shomali, T., Soltanian, S., & Akhlaghi, M. (2019). Comparative single-dose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) at health and experimental infection with *Streptococcus iniae* or *Lactococcus garvieae*. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 42(2), 214-221. <http://doi.org/10.1111/jvp.12736>.
- Smith, P. (2007). A survey of methods and protocols currently being used to determine antimicrobial susceptibility of bacteria associated with fish disease. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 27(1), 18-2.
- Smith, P., & Christofilogiannis, P. (2007). Application of normalised resistance interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture*, 272(1-4), 223-230.
- Taçbaşı, E. (2018). Sağlıklı ve *Lactococcus garvieae* ile enfekte Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Florfenikol'ün farmakokinetiği. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara.
- Turner, P.V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M.A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600-613.
- Türe, M., Haliloğlu, H.İ., Altuntaş, C., Boran, H., & Kutlu, İ. (2014). Comparison of experimental susceptibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Turbot (*Psetta maxima*), Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 507-513. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_22.
- Rairat, T., Hsieh, C.Y., Thongpam, W., Sung, C.H., & Chou, C.C. (2019). Temperature-dependent pharmacokinetics of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following single oral and intravenous administration. *Aquaculture*, 503, 483-488.
- Rigos, G., & Smith, P. (2015). A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 77-106. <https://doi.org/10.1111/raq.12055>.
- van de Riet J. M., Potter R. A., Christie-Fougere M., & Burns B. G. (2003). Thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 23, 510-514.
- Vinarov, Z., Abdallah, M., Agundez, J., Allegaert, K., Basit, A. W., Braeckmans, M., Ceulemans, J., Corsetti, M., Griffin, B., Grimm, M., Keszthelyi, D., Koziolok, M., Madla, C. M., Matthys, C., McCoubrey, L. E., Mitra, A., Reppas, C., Stappaerts, J., Steenackers, N., Trevaskis, N. L., Vanuytsel, T., Vertzoni, M., Weitschies, W., Wilson, C., & Augustijns, P., (2021). Impact of gastrointestinal tract variability on oral drug absorption and pharmacokinetics: An UNGAP review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 162, 105812. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105812>.
- Wang, W., Dai, X., Li, Z., & Meng, Q. (2009). Tissue distribution and elimination of florfenicol in Topmouth Culter (*Culter alburnus*) after Oral Administration. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 216-221.
- Yanong, P. R., Curtis, W. E., Simmons, R., Bhattaram, V. A., Gopalakrishnan, M., Ketabi, N., Nagaraja, N. V., & Derendorf, H. (2005). Pharmacokinetic studies of florfenicol in Koi Carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment. *Journal of Aquatic Health*, 17(2), 129-137. <https://doi.org/10.1577/H03-065.1>.



ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238

Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1149397>



Propil Tiyourasil (PTU) ve L-Tiroksin ile Oluşturulan Deneysel Hipo- ve Hipertiroidizm Erişkin Sıçanların Hipokampusünde Doku Lipid Peroksidasyonu, Glutasyon ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Araştırmalar

Bilal Cem LİMAN ¹, Narin LİMAN ², Muhammed Yasin TEKELİ ¹, Ergül ERGEN ²,
Ural Kemal KAVRAAL ²

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı

² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 27.07.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 16.09.2022

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı deneysel hipo- ve hipertiroidizm oluşturulan sıçan modelinde hipokampusde lipid peroksidasyon ve düzeyleri ile antioksidan enzim aktivitelerinin değişip değişmediğini ortaya koymaktır. **Materyal ve Metod:** Çalışmada kullanılan 72 yetişkin erkek Wistar albino sıçan aşağıdaki şekilde gruplandırıldı: (1) kontrol grubu (2) hipotiroidizm grubu: 4 hafta boyunca 10 mg/kg/gün propiltiourasil (PTU)'in intraperitoneal enjeksiyonu ile indüklendi; (3) hipertiroidizm grubu: 4 haftalık tiroksin enjeksiyonu (0.3 mg/kg/gün) ile indüklendi. Hipo ve hipertirodi oluşturulan sıçanların hipokampuslerinde lipid peroksidasyon düzeyleri, glutasyon (GSH) düzeyi, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon redüktaz (GR) düzeyleri ELISA ile incelendi. **Bulgular:** Çalışmamızın ELISA analiz sonuçları hipo- ve hipertiroidizmin hipokampal lipid peroksidasyonunu etkilemediğini, ancak hipotiroidi oluşturulan sıçanların hipokampus örneklerinde SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu (P<0.05) ve hipokampusde antioksidan enzimlerin düzeylerinin değişmediğini gösterdi. **Sonuç:** Tiroid hormon (TH) bozukluğunun hipokampusün antioksidan savunma sisteminde bazı değişikliklere neden olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Hipotiroidizm, Hipertiroidizm, Propiltiourasil, L-tiroksin, Hipokampus, Antioksidan enzim sistemler

Investigations on Tissue Lipid Peroxidation, Glutathione and Antioxidant Enzyme Levels in the Hippocampus of Adult Rats in Experimental Hypo- and Hyperthyroidism Induced by Propyl Thiouracil (PTU) and L-Thyroxine

ABSTRACT

Objective: This study aimed to explore the effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on the lipid peroxidation and glutathione levels, and the activities of antioxidant system in the rat hippocampus. **Material and Methods:** The study included 72 adult male Wistar albino rats which were grouped as follows: (1) control group (2) hypothyroidism group: induced by intraperitoneal injection of 10 mg/kg/day propylthiouracil (PTU) for 4 weeks; (3) hyperthyroidism group: induced by 4-week thyroxine injection (0.3 mg/kg/day). The levels of lipid peroxidation, glutathione (GSH), antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in the hippocampus of rats with hypo- and hyperthyroidism were examined using ELISA techniques. **Conclusion:** It can be said that TH disorder may affect cognitive performance by causing some changes in the antioxidant defense system of the hippocampus. **Keywords:** Hypothyroidism, Hyperthyroidism, Propylthiouracyl, L-thyroxine, Hippocampus, Antioxidant enzyme systems.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Bilal Cem LİMAN, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

E-mail: limanb@erciyes.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Liman, B. C., Liman, N., Tekeli, M. Y., Ergen, E & Kavraal, U. K. (2022). Propil Tiyourasil (PTU) ve L-tiroksin ile oluşturulan deneysel hipo- ve hipertiroidizmde erişkin sıçanların hipokampusünde doku lipid peroksidasyonu, glutasyon ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine araştırmalar. *BAUN Sağ Bil Derg, 11(Supplement 1): 22-28.*

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1149397>



BAUN Sağ Bil Derg, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Tiroid hormon seviyelerindeki değişiklikler, mitokondriyal solunum üzerine bilinen etkileri nedeniyle in vivo hücresel oksidatif stresin ana fizyolojik modülatörlerindedir (Mates ve ark., 1999; Yılmaz ve ark., 2003). Son yıllarda tiroid hormon bozukluğunun farklı beyin bölgelerinde antioksidan savunma sisteminde değişiklikler oluşturduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin propil tiourasil (PTU) ile indüklenen hipotiroidili sıçanlarda oksidatif stresin arttığı ve öğrenme yeteneğinin bozulduğu (Pan ve ark., 2012) ve hipokampal doku hasarı mekanizmalarının artmış oksidatif stres kaynaklı apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Guo ve ark., 2014).

Tiroid hormonu oksidan gibi davranarak DNA hasarı oluşturabilir (Dobrzynska ve ark., 2004; Venditti ve di Meo, 2006). Hidrojen peroksit, tiroid hormon biosentezi için gerekli bir faktördür. Tiroid bezinde NADPH oksidaz (NOX) ailesine ait oksidaz 1 (DUOX1) ve 2 (DUOX2) tarafından üretilir (Leto ve ark., 2009; Rigutto ve ark., 2009). H₂O₂ tiroid hormon sentezi için anahtar enzim olan tiroid peroksidaz (TPO) aktivitesi için gereklidir. Demir TPO'da mevcut olduğundan ve H₂O₂ de TPO aktivitesi için vazgeçilmez olduğundan tiroid bezi, belirli koşullar altında aşırı miktarda Fe²⁺ veya H₂O₂ veya her ikisine maruz kalabilir ve bu da ek Fenton reaksiyonu ve dolayısıyla oksidatif hasar için uygun koşullar yaratabilir. Tiroid stimulan hormon (TSH), tiroid bezinde H₂O₂ üretiminde rol oynar (Brent, 2011; Hwang ve ark., 2017). Artmış kan TSH konsantrasyonunun eşlik ettiği herhangi bir koşulda, artan H₂O₂ üretimini artan serbest radikal özellikle hidroksil radikal (OH•) oluşumu izler (KarbownikLewińska ve Kokoszko-Bilska, 2012). Bu çalışmada PTU ve L-tiroksin verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizmin hipokampüsde şekillendirdiği antioksidan enzimlerin düzeylerindeki değişikliklerin düzeyleri belirlendi. PTU verilerek hipotiroidizm ve L-tiroksin uygulanarak hipertiroidizm oluşturulan sıçanların hipokampüslerinde lipid peroksidasyon düzeyleri ile oksidatif strese karşı enzimatik ve peptid savunma sistemlerinin önemli bileşenleri olan antioksidatif enzimlerden katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz (GSH)'in düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları ve grupların oluşturulması

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden alınan 72 adet 39 günlük erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar her bir kafeste 5 hayvan olacak şekilde 3 gün süreyle herhangi bir uygulama yapılmaksızın laboratuvar koşullarına adapte olmaları için bekletildi. Takiben her bir grupta 28 hayvan olacak şekilde rasgele 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (Kontrol grubu): Serum fizyolojik uygulanan grup. Grup 2 (Hipotiroidli

grup): 6-n- (PTU) verilen grup Grup 3 (Hipertiroidli grup): L-tiroksin verilen grup Kontrol grubu hayvanlara 100 ml'sinde 1 ml 0.1 N NaOH içeren serum fizyolojik solüsyonu her bir hayvana 1 ml olacak şekilde 28 gün süreyle intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Hipotiroidizm oluşturmak üzere her bir hayvana 10 mg/kg canlı ağırlık/gün hesabıyla PTU 0.1 N NaOH'de çözülürdü ve takiben intraperitoneal olarak enjekte edildi (Yang ve ark. 2018). Hipertiroidizm oluşturmak amacıyla da 6 mg L-tiroksin 1 ml 0.1 N NaOH içinde çözülürdüktan sonra total hacim 100 ml'ye tamamlandı ve hayvanlara 0,3 mg/kg/gün hesabıyla intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı (Moğulkoç ve ark., 2006).

Deney gruplarındaki enjeksiyon süreleri kontrol grubunda olduğu gibi 28 gün olarak belirlendi. Her bir gruptaki hayvanlar 3 günde bir tartılarak canlı ağırlık artışları hesaplandı ve buna göre de PTU ve L-tiroksin dozları artırıldı. Denemeler süresince gruplardaki bütün sıçanlar musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi.

Kan örneklerinin alınması ve uygulanan analizler

Denemelerin sonunda tüm gruplardaki sıçanların periferik kanlarında TSH, total triiyodotronin (T3) ve tiroksin (T4) hormon düzeylerini düzeylerini belirleyebilmek için öncelikle kan örnekleri alındı. Kan örneği alım sürecinde hayvanlar ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg)'in intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi edildi ve hayvanların kalbinden plazma ayrıştırıcı tüpler ve serum ayrıştırıcı tüpler içine kan örnekleri alındı. Serum ayrıştırıcı tüpler içine alınan kan örnekleri 1800g'de 10 dakika süre ile plazma ayrıştırıcı tüpler içine alınan kan örnekleri ise 2000g'de 15 dak. süre ile santrifüj edildi ve elde edilen plazma ve serum örnekleri ependorflar içine paylaştırıldıktan sonra ölçüm yapılacak güne kadar saklanmak üzere -80 °C'deki dondurucuya kaldırıldı.

Doku lipid peroksidasyonu, glutatyon ve antioksidan enzim düzeylerinin belirlenmesinde kullanılacak doku örneklerinin alınması

Enzim düzeylerinin belirlenmesi için her bir deney grubundan 8'er hayvan anestezi altına alınıp beyin örnekleri kafatasından çıkarıldıktan sonra yeterli doku ekstraktı elde edebilmek için sağ ve sol hipokampüs birlikte beyinden ayrılarak fosfat tampon solüsyonu (fosfat buffer salin, PBS, pH:7.4) ile yıkandı. Takiben dokular önce sıvı azotta donduruldu ve ardından da -80 °C'deki dondurucuya kaldırıldı.

Her bir gruba ait hayvanlardan elde edilen doku ekstraktlarında tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve antioksidan enzim düzeyleri (SOD, CAT, GPX, GR) ticari ELISA kitleri kullanılarak firma tarafından önerilen prosedüre göre analiz edildi.

İstatistiksel analiz

ELISA ile elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS paket programında yapıldı. Tüm gruplara ait değerler arasında Lipid peroksidasyon ve GSH düzeyleri ile enzimlerin düzeylerinin farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için parametrik testlerden Tek yönlü varyans analizi testi (ANOVA), farklılığın

hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için ise Post hoc Tukey testi uygulandı.

Araştırmanın etik yönü

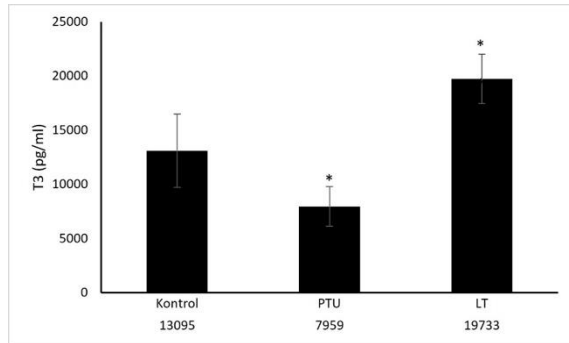
Mevcut araştırma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16.08.2017 tarihli 17/072 sayılı etik kurul kararı izni ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Kan örneklerinde T3, T4 hormon ve TSH hormon düzeyleri: Çalışmada hayvanlarda hipotiroidi ve hipertiroidi oluşturulup oluşturulmadığını belirlemek amacıyla alınan kan örneklerinde T3, T4 hormon ve TSH hormon düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi. Bu değerler aşağıdaki Tablo 1, 2, 3 ve Şekil 1, 2 ve 3'te verilmiştir.

Tablo 1. Kontrol, hipotiroidi ve hipertiroidi grubunda T3 hormon düzeyleri.

Gruplar	T3 hormon düzeyleri (pg/ml) X ± SE
Kontrol	13095±3396.5
Hipotiroid	7959±1823.1
Hipertiroid	19733±2263.1

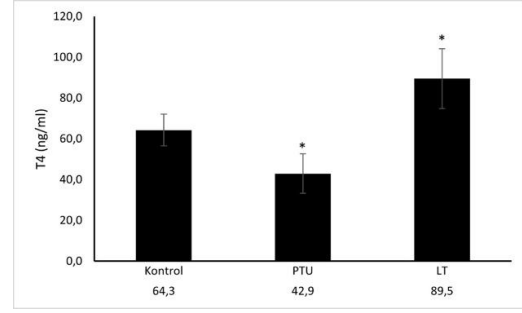


Şekil 1. T3 hormon düzeyleri.

*: Kontrolle kıyaslandığında p<0.05)
Oneway ANOVA ve post-hoc Tukey testi.

Tablo 2. Kontrol, hipotiroidi ve hipertiroidi grubunda T4 hormon düzeyleri.

Gruplar	T4 hormon düzeyleri (ng/ml) X ± SE
Kontrol	64.3±7.75
Hipotiroidi	42.9±9.71
Hipertiroidi	89.5±14.64

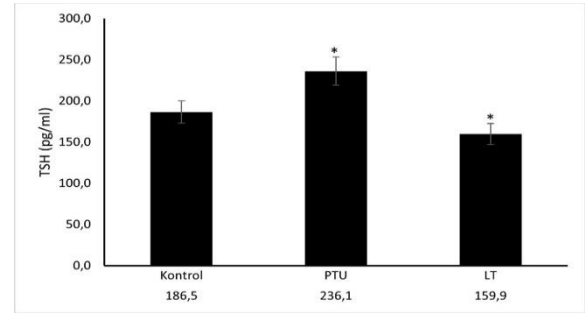


Şekil 2. T4 hormon düzeyleri.

*: Kontrolle kıyaslandığında p<0.05.
One way ANOVA post-hoc Tukey testi.

Tablo 3. Kontrol, hipotiroidi ve hipertiroidi grubunda TSH hormon düzeyleri

Gruplar	TSH hormon düzeyleri (pg/ml) X ± SE
Kontrol	186.5±13.5
Hipotiroidi	236.1±17.1
Hipertiroidi	159.9±12.7

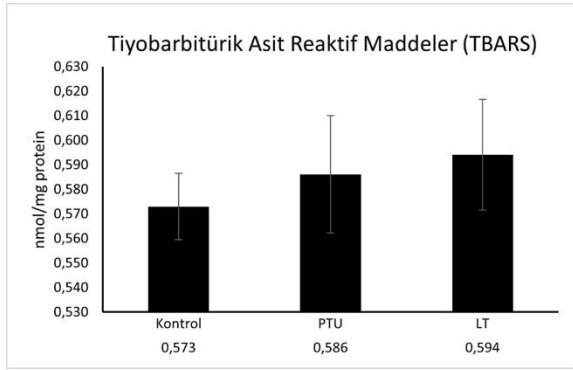


Şekil 3. TSH hormon düzeyleri.

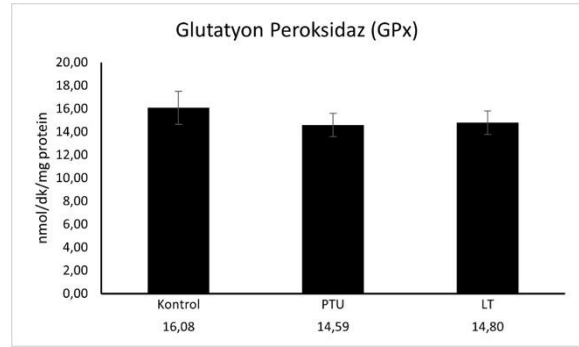
*: Kontrolle kıyaslandığında p<0.05.
Oneway ANOVA post-hoc Tukey testi.

Doku Lipid Peroksidasyon, Glutasyon ve Antioksidan Enzim Düzeyleri

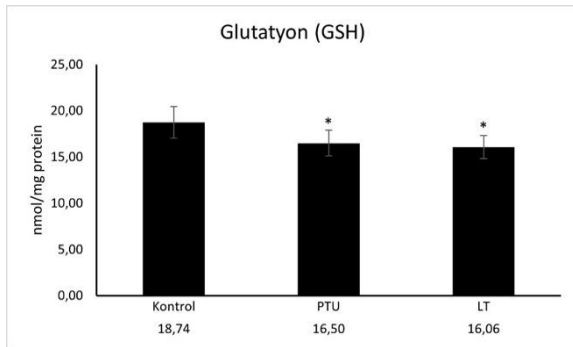
Sıçanların hipokampuslerinde oksidatif stresin önemli bir belirteci olan lipid peroksidasyon düzeyleri ile oksidatif strese karşı enzimatik ve peptid savunma sistemlerinin önemli bileşenleri olan antioksidatif enzimlerden CAT, (GPx) ve GR'ın aktiviteleri ticari kitler kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde hipotiroid ve hipertiroidli ratların hipokampus örneklerinde glutasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve gruplar arası farklılıkların önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Ayrıca hipotiroidi oluşturulan ratların hipokampus örneklerinde SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve gruplar arası farklılıkların önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).



Şekil 4. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizm gruplarında tiyobarbitürük asit reaktif maddeler (TBARS) düzeyleri.

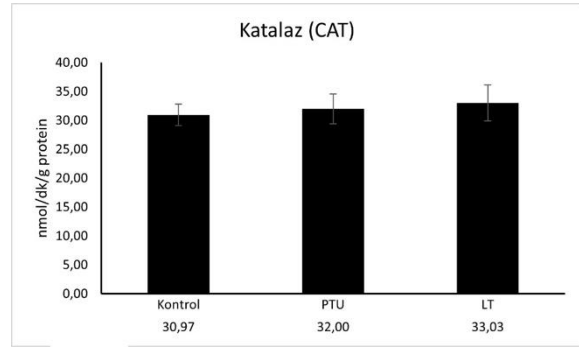


Şekil 7. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizm gruplarında glutasyon peroksidaz (GPx) düzeyleri

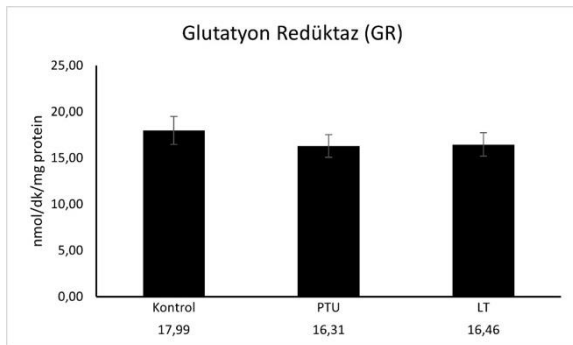


Şekil 5. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizm gruplarında glutasyon (GSH) düzeyleri.

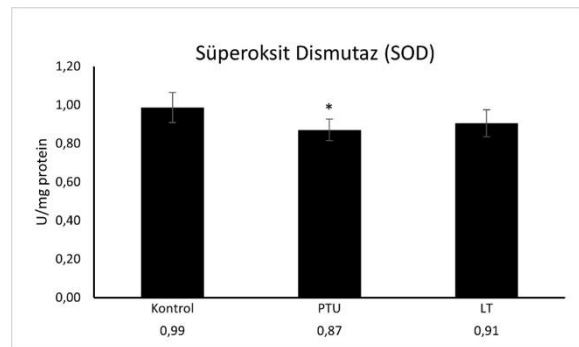
* $p \leq 0.05$ kontrolle kıyaslandığındaki önemliliği göstermektedir.



Şekil 8. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizm gruplarında katalaz (CAT) düzeyleri.



Şekil 6. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidizm ile hipertiroidizm gruplarında glutasyon redüktaz düzeyleri.



Şekil 9. Kontrol, Propil tiourasil (PTU) ve L-tiroksin (LT) verilerek oluşturulan deneysel hipotiroidi ile hipertiroidi gruplarında süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri.

* $p \leq 0.05$ kontrolle kıyaslandığındaki önemliliği göstermektedir.

TARTIŞMA

Çalışmada (PTU) verilerek hipotiroidizm oluşturulan ve L-tiroksin verilerek hipertiroidizm oluşturulan sıçan modelinde, oksidatif stresin önemli bir belirteci olan lipid peroksidasyon düzeyleri (TBARS) ile oksidatif strese karşı enzimatik ve peptid savunma sistemlerinin önemli bileşenleri olan antioksidatif enzimlerden (CAT), GPx) ve GR'nin hipokampus dokusundaki düzeylerinin değişip değişmediği araştırıldı. Hipotiroidizmin ve hipertiroidizmin oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla hormon ölçümleri yapıldı. Sonuçlar PTU ile indüklenmiş hipotiroidizm oluşturulan sıçanlarda yapılan önceki çalışmaların sonuçları (Hang ve ark., 2005; Hidayat ve ark., 2019) ile örtüşmekte olup, çalışmamızda primer hipotiroidizmin başarıyla oluşturulduğunun kanıtıdır. Hipertiroidili sıçanlarda ise total T3 ve T4 değerleri kontrol ve hipotiroidi gruplarından önemli ölçüde yüksek, TSH düzeyleri ise bu gruplardan önemli derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgular da L-tiroksin'in hipertiroidizmi şekillendirdiğini göstermektedir (Charles, 2018; Yang ve ark., 2018). Serum hormon düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde çalışmamızda hipotiroidizmi indüklemek için kullanılan PTU'nun T3 ve T4 hormon düzeylerini düşürerek ve TSH düzeyini arttırarak tiroid bezinin aktivitesini değiştirdiğini ve böylece hipotiroidizme neden olduğunu (Elkalawy ve ark., 2013; Soukup ve ark., 2001), LT ise T3 ve T4 hormon düzeylerini arttırarak ve TSH düzeyini düşürerek tiroid bezinin aktivitesini değiştirdiğini ve böylece hipertiroidizme neden olduğunu doğrulamaktadır (Charles, 2018).

Lipid peroksidasyonu, ROS ailesinin farklı radikal ve radikal olmayan üyeleri tarafından veya farklı dokularda çeşitli ajanlar tarafından önceden oluşturulmuş lipid hidroperoksidlerin katalitik ayrışmasıyla tetiklenen ve teşvik edilen benzersiz bir oksidatif hasar modudur (Fukai ve ark., 2001; Niki ve ark. 2005; Sinet ve Ceballos-Picot, 1992 Malondiladehid (MDA)'nın miktar tayini için en yaygın olarak kullanılan test, TBARS testidir (Marnett 1999). MDA, 532-535 nm'de ölçülen pembe bir kromojen (TBARS) oluşturan tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer (Trevisan ve ark., 2001). Çalışmamızda, TBARS düzeylerinin hipo- ve hipertiroidili sıçanların hipokampuslerinde kontrol grubuna göre hafif yükselmiş olduğu, ancak gruplar arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı tespit edildi. Cano-Europa ve ark. (2008), kontrol, hipotiroidili ve T4 ile tedavi edilen hipotiroidili gruptaki sıçanların serebellum, striatum ve motor kortekste lipid peroksidasyon düzeylerinin farklılık göstermediğini, ancak ilginç bir şekilde, kontrol grubu lipid peroksidasyon değerlerine göre 3 haftalık metimazol uygulanarak hipotiroidi oluşturulan sıçanların hipokampusünde (%417) ve amigdalasında (%287) önemli bir artış olduğunu, tedavi grubunda ise kontrol grubu değerlerine dönüş olduğunu göstermişlerdir. Çalışma bulgularımız Cano-Europa

ve ark. (2008)'nın bulgularıyla çelişmektedir. Bunun nedeni bizim çalışmamızda hipotiroidizmi indüklemek için PTU 57 kullanmamız, Cano-Europa ve arkadaşlarının (2008)'nin ise metimazol kullanmaları olabilir. Sunulan çalışmada hipo- ve hipertiroidizmin hipokampusdeki SOD aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmamızın ELISA analiz sonuçları hipotiroidi oluşturulan sıçanların hipokampus örneklerinde SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu ($p<0,05$) göstermektedir. Oktay ve ark. (2017) hipotiroidili sıçanların beyinlerinde SOD enzim aktivitesinin azaldığını, hipertiroidili sıçanlarda ise kontrol grubuna göre arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da hipotiroidili sıçanların hipokampusünde azalmış SOD aktivitesinin saptanması tiroid hormon eksikliğine bağlı olarak hipokampusün antioksidan SOD enzim aktivitesinin düştüğünün önemli bir kanıtıdır. Antioksidan enzimlerden bir diğeri demir içeren bir hemoprotein olan CAT temel olarak peroksizomlarda tarafından sentezlenir. Mitokondriyonlarda oluşan süperoksit radikalleri ilk olarak Mn-SOD (SOD 2) ve GPx enzimleri tarafından yok edilir. Ancak önemli bir miktar H_2O_2 mitokondriden ayrılarak sitosole geçer. CAT sitosole geçen H_2O_2 su ve oksijene dönüştürür (Radi ve ark., 1991). ELISA analiz sonuçları hipokampusde CAT enzim düzeylerinin değişmediğini gösterdi. GSH sistemi vücuttaki oksidatif strese karşı en önemli endojen savunma sistemidir. Çalışmada sadece indirgenmiş GSH düzeyleri belirlendi. Hipotiroid ve Hipertiroidli ratların hipokampus örneklerinde glutatyon düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve gruplar arası farklılıkların önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bizim hipokampus için geçerli olan bulgularımıza benzer olarak Oktay ve ark. (2017), hipo-ve hipertiroidili sıçanların beyinlerinde GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu saptamışlardır. Çalışmamız bulguları diğer nörolojik hastalıklarda bildirilenlere (Dringen ve ark., 2000; Dwivedi ve ark., 2020; Wu ve ark. 2004; Zhu ve ark., 2006) benzer olarak tiroid bezinin fonksiyonel bozukluklarında da hipokampusde GSH eksikliğinin oluştuğunu göstermektedir.

SONUÇ

PTU ve L-tiroksin kullanılarak oluşturulan deneysel hipo-ve hipertiroidili sıçan modelinde hipokampusde lipid peoksidasyon düzeyinin yüksek oranda oluşmadığı, ancak vücuttaki oksidatif strese karşı en önemli endojen savunma sisteminlerinden GSH düzeylerinin ve SOD'un aktivitesinin değiştiği saptanmış olup, bu da tiroid fonksiyon bozukluğuna bağlı bellek ve öğrenme yetersizliklerinde bu moleküllerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: BCL, NL; **Gereç, yöntem ve veri toplama:** BCL, NL, MYT; EE, UKK; **Veri analizi ve yorum:** BCL; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** BCL, NL.

Finansal Destek

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP2017) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Brent, G.A. (2011). Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation* 122: 3035-3043. <https://doi.org/10.1172/JCI60047>.
- Cano-Europa, E., Pérez-Severiano, F., Vergara, P., Ortiz-Butrón, R., Ríos, C., Segovia, J., Pacheco-Rosado, J. (2008). Hypothyroidism induces selective oxidative stress in amygdala and hippocampus of rat. *Metabolic Brain Disease* 23: 275-287. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9099-0>.
- Charles, H.E. (2018). Hypothyroidism can be given between meals with similar effectiveness at various times of the day. *Clinical Thyroidology* 30: 456-459. <https://doi.org/10.1089/ct.2018;30.456-459>
- Dobrzynska, M.M., Baumgartner, A., Anderson, D. (2004). Antioxidants modulate thyroid hormone-andnoradrenaline-induced DNA damage in human sperm. *Mutagenesis* 19: 325-330. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh037>
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry* 267: 4912-4916. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x>
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., Mandal, P.K. (2020). Glutathione in Brain: Overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation and potential therapeutic role in brain disorders. *Neurochemical Research* 45: 1461-1480.
- Elkalawy, S., Abo-Elmour, R., El, D.D., Yousry, M. (2013). Histological and immunohistochemical study of the effect of experimentally induced hypothyroidism on the thyroid gland and bone of male albino rats. *Egypt J Histology* 36: 92-102. <https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000424169.63765.ac>
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidans and Redox Signaling* 15: 1583-1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Guo, Y., Wan, S., Zhong, X., Zhong, M.K., Pan, T.R. (2014). Levothyroxine replacement therapy with vitamin E supplementation prevents the oxidative stress and apoptosis in hippocampus of hypothyroid rats. *Neuroendocrinology Letters* 35: 684-690.
- Hang, X.W., Yang, R.I., Zhao, Z.Y., Ji, C., Yang. (2005) Mechanism for apoptosis of hippocampus neuron induced by hypothyroidism in perinatal rats. *Journal of Zhejiang University, Medical sciences* 34: 298-303. <https://doi.org/10.3785/j.issn.1008-9292.2005.04.003>
- Hidayat, M., Khaliq, S., Khurram, A., Lone, K. (2019). Protective effects of melatonin on mitochondrial injury and neonatal neuron apoptosis induced by maternal hypothyroidism. *Melatonin Research*, 2: 42-60. <https://doi.org/10.32794/mr11250040>
- Hwang, J.H., Kang, S.Y., Kang, A.N., Jung, H.W., Jung, C., Jeong, J.H., Park, Y.K. (2017). MOK, a pharmacopuncture medicine, regulates thyroid dysfunction in L-thyroxin-induced hyperthyroidism in rats through the regulation of oxidation and the TRPV1 ion channel. *BMC Complement Alternative Medicine*, 17: 535. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2036-1>
- Karbownik-Lewińska, M., Kokoszko-Bilska, A. (2012). Oxidative damage to macromolecules in the thyroid- experimental evidence. *Thyroid Research*, 5: 25. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-5-25>
- Leto, T.L., Morand S., Hurt, D., Ueyama, T. (2009). Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Noxfamily NADPH oxidases. *Antioxidans and Redox Signaling*, 11: 2607- 2619.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424: 83-95.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603 [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
- Mogulkoç, R., Baltacı, A.K., Öztekin, E., Aydın, L., Sivrikaya, A. (2006). Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. *Life Science*, 79: 311-315. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.009>
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 668-376. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.072>
- Oktay, S, Uslu L, Emekli N. (2017). Effects of altered thyroid states on oxidative stress parameters in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28: 159-165.
- Pan, T.R., Zhong, M.K., Zhong, X., Zhang, Y.Q., Zhu, D. (2012). Levothyroxine replacement therapy with vitamin E supplementation prevents oxidative stress and cognitive deficit in experimental hypothyroidism. *Endocrine*, 43:434-439. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9801-1>
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 22028-22034.

- Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J.E., Corvilain, B., Miot, F., De Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 6725–6734.
- Sinet, P.M. and Ceballos-Picot, I. (1992). Free Radicals in the Brain. *Springer Verlag*, Berlin, 91-98.
- Soukup, T., Zacharová, G., Smerdu, V., Jirmanová I. (2001). Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiological Research*, 50: 619–626.
- Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim J., Carosella, A.M., Armstrong, D. (2001). Correlates of markers of oxidative status in the general population. *American Journal of Epidemiology*, 154:348-356.
- Venditti, P., Balestrieri, M., Di Meo, S., De Leo, T. (1997). Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *Journal of Endocrinology*, 155: 151-157.
- Yilmaz, S., Ozan, S., Benzer, F., Canatan, H. (2003). Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochemistry & Function*, 21: 325-330. <https://doi.org/10.1002/cbf.1031>
- Wu, G., Fang Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134: 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Yang, J., Yi, N., Zhang J., et al. (2018). Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor. *Scientific Report*, 8: 4004. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22405-7>
- Zhu, Y., Carvey, P.M., Ling, Z. (2006). Age-related changes in glutathione and glutathione related enzymes in rat brain. *Brain Research*, 1090: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.063>



ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159774>



Çevresel Kirleticiler ve Plasental Transporterlar: PCB ile SLC ve ABCB1 Örneği

Begüm YURDAKÖK DİKMEN¹, Recep UYAR², Özgür KUZUKIRAN³,
Mehmet Altay ÜNAL⁴, Hasan Tolga ÇELİK⁵, Ümmü Gülsüm BOZTEPE²,
Kübra KARAKAŞ ALKAN⁶, Özgür ÖZYÜNCÜ⁷, Yağmur TURGUT BİRER²,
Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ⁸, Halit KANCA⁹, Çağdaş AKTAN¹⁰, Ayhan FİLAZİ¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,

² Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

³ Çankırı Karatekin Üniversitesi Eldivan Meslek Yüksekokulu,

⁴ Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü,

⁵ Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,

⁶ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,

⁷ Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,

⁸ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü,

⁹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,

¹⁰ Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

Geliş Tarihi / Received: 10.08.2022, **Kabul Tarihi / Accepted:** 29.08.2022

ÖZ

Amaç: Çevresel kirletici maruziyetine bağlı olarak işlevselliği değişen ve bozulan membran transporterları nedeniyle, bu maddeler plasental bariyeri geçerek plasental kan dolaşımına geçebilmektedir. Çalışmada, çevresel kirleticilerin bu transport proteinleriyle etkileşimlerinin moleküler boyutta incelenmesi amaçlanmaktadır. **Gereç ve Yöntem:** Araştırma kapsamında hemokoryal yapıya sahip insan ve endotelyokoryal yapıya sahip köpek plasentasında; 28 kirleticinin analizi GC-MS ile yapılmış (PCB, PBDE, PAH ve Organik klorlu pestisitler); RNaseq ile plasental tüm genom ifade profili araştırılmış, in silico (moleküler kenetleme) ve in vitro (PCB 101, PCB118 uygulanan plasental hücre hattı HTR8/SVneo'da SLC ve ABCB1 mRNA ifadesi) değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Test edilen 60 örnek içerisinde bir örnekte PCB101 826.4µg/kg; 23 örnekte ise PCB118 0.14 ile 41.9µg/kg arasında bulundu. Biyoinformatik bulgularda sekans analizi yapılan 55 numunede PCB pozitif ve negatif numuneler arasında 742 gende farklılık bulundu (p<0.05). Bu genler içerisinde 14 adet SLC ve 2 adet ABC ailesinde gruplara göre ifade farklılığı bulundu. SLC içerisinde en düşük p değerine sahip ilk iki gen SLC4A1 (p=0.000126) ve SLC38A5 (p=0.000563) olurken, ABC'ler içerisinde ABCA8 (0.022997) ve ABCC1 (p=0.025288) olarak bulundu. qPCR bulgularına göre hem ABCB1 için hem de SLC22A6 için mRNA ifadesinde artış görülmekte birlikte bu artış ABCB1 için daha yüksek bulundu (p<0.05). **Sonuç:** ABCB1 gen ifadesi ve PCB ligandlarına bağlanma affiniteleri de SLC (SLC1A5)'ye göre daha yüksek bulundu. Sonuç olarak PCB maruziyetinin ABCB1 ifadesini değerlendirmeye alınan SLC'lere göre daha fazla etkilediği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Placenta, Genomik, PCB, SLC, ABCB1.

Environmental Contaminants and Placental Transporters: Example of PCB vs. SLC and ABCB1

Abstract

Objective: Due to widespread presence and exposure to environmental pollutants, structural and functional changes in membrane transporters could occur, leading to placental transport of these compounds. In this study, the effects of PCBs on SLC and ABCB1 membrane transport molecules were evaluated. **Materials and Methods:** Hemochorial structured human placenta and endotheliochorial structured dog placenta were analyzed for 28 pollutants (PCB, PBDE, PAH and Organochlorines) using GC-MS. The expression profile of the placental whole genome were investigated with RNaseq, and in silico (molecular chelation) and in vitro (SLC and ABCB1 mRNA expression in the placental cell line HTR8/SVneo treated with PCB 101, PCB118) were evaluated. **Results:** PCB101 826.4µg/kg in one sample out of 60 samples tested; In 23 samples, PCB118 was found to be between 0.14 and 41.9µg/kg. In the bioinformatics findings, there were differences in 742 genes between PCB positive and negative samples in 55 samples that were sequenced (p<0.05). Among these genes, expression differences were found in 14 SLC and 2 ABC families according to groups. The first two genes with the lowest p values in SLC were SLC4A1 (p=0.000126) and SLC38A5 (p=0.000563), while ABCA8 (p=0.022997) and ABCC1 (p=0.025288) were found in ABCs. According to the qPCR findings, there was an increase in mRNA expression for both ABCB1 and SLC22A6, but this increase was found to be higher for ABCB1 (p<0.05). **Conclusion:** ABCB1 gene expression and binding affinities to PCB ligands were also higher than SLC (SLC1A5). Placental PCB exposure affected ABCB1 expression more than the tested SLCs.

Keywords: Placenta, Genomic, PCB, SLC, ABCB1.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Recep UYAR, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

E-mail: recepuyar@gmail.com

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Yurdakök Dikmen, B., Uyar, R., Kuzukiran, O., Ünal, M.A., Çelik, H. T., Boztepe, U. G., Karakas Alkan, K., Ozyuncu, O., Turgut Birer, Y., Özdağ Sevgili, H., Kanca, H. Aktan, C & Filazi, A. (2022). Çevresel kirleticiler ve plasental transporterlar: PCB ile SLC ve ABCB1 örneği. *BAUN Sağ Bil Derg*, 11(Supplement 1): 29-37.

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159774>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Çevresel kirleticiler arasında kalıcı organik kirleticiler (KOKlar) uzun mesafelere taşınabilmeleri, çevrede kalıcı olmaları, ekosistemde biyoakümüle ve biyomagnifiye olmaları nedeniyle küresel olarak endişe oluşturan kimyasallar olarak değerlendirilmektedir. KOK'ların plasentadan fetüse geçişinde önemli olan transport proteinlerinin ifadesi ve işlevine ilişkin türler arası pek çok ortak nokta olsa da ifade düzeyi ve ifadesi farklılıklar göstermektedir. Aynı ortamı paylaşsalar bile köpek ve insanlarda KOK konsantrasyonlarında, özellikle metabolizmasına bağlı olarak farklılıklar görülebilmektedir. Çevresel faktörlerin, hastalıkların etiyojoloji ve patogenezinde türler arasında ortak rol oynayabileceği düşünüldüğünde türler arası farklılıkların, bu proteinlerin fonksiyonuna yönelik etkilerinin araştırılması ve ilişkilendirilebilmesi açısından temel oluşturacağı görülmektedir (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022).

Plasentada bulunan trofoblast hücrelerindeki transport proteinleri, ksenobiyotiklerin transplasental dispozisyonunda (hücre içerisine alınması, uzaklaştırılması) görev alarak fetüsü maternal toksinlerden korur (Burton GJ ve ark. 2015). Potansiyel zararlı olan kimyasalların fetal kompartimana geçmesini engelleyen transport proteinleri arasında özellikle efluks transportundan sorumlu ATP'ye bağımlı olan, ATP-bağımlı taşıyıcı kaset (ATP-binding cassette-ABC) ailesi ve influks ya da hücre membranında iki taraflı taşımayı sağlayan çözünmüş-likit- taşıyıcı (solute liquid carrier-SLC) ailesi öne çıkmaktadır. Bu iki ailenin trofoblastın apikal ve bazolateral kısımlarında koordineli ekspresyonu, ilaç ve kimyasalların geçişinde, ilaç-ilaç etkileşimlerinde ve ilaca bağımlı yanıt ve toksik etkilerin görülmesinde belirleyici olmaktadır (Pang KS, ve ark. 2010). SLC ailesinin 380 üyesinin 48 alt ailesi içerisinde sadece 19'unun (organik anyon transport polipeptid-SLC0, oligopeptid transportör-SLC15, organik anyon/kasyon/zwitteriyon transportör- SLC22, organik kasyon transportör- SLC47) ksenobiyotik transportundaki işlevi tespit edilebilmiştir (Lin L ve ark. 2015). ABC transport genlerinin yedi alt ailesi insanda 49 farklı taşıyıcı proteinin kodlanmasından sorumludur. Bunlardan özellikle ABCB (p-glikoprotein, MDR1, ABCB1 gibi), ABCC (çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler- MRP gibi) ve ABCG (BCRP, ABCG2 gibi) alt aileleri ilaç ve ksenobiyotiklerin taşınmasında önem taşır. Plasentadaki ABC transportları trofoblast hücresinden maternal dolaşıma maddeleri aktif olarak pompalar (Wakabayashi K ve ark. 2006). Trofoblast hücrelerindeki ABC transportlarının apikal yüzeyde (P-glikoprotein/P-gp, BCRP, MRP2) bazolateral yüzeye göre (MRP1) plasental bariyerde etkin olduğu bildirilmiştir (Ni Z ve ark. 2011). SLC transportlarından ise OCT (organik kasyon transport), OAT (organik anyon transport), karnitin

transportör (OCTN), nükleosid transportör (CNT), organik anyon transport polipeptidleri (OATP) ve çoklu ilaç ve toksin atım proteinlerinin (MATE) ilaç ve ksenobiyotiklerin taşınmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Staud, Cerveny, and Ceckova 2012). Bu maddelerin transport protein ekspresyonundaki bozukluklara (polimorfizm, kimyasal veya diğer aracılı ekspresyon azalması/artması, fonksiyon bozuklukları) bağlı olarak fetüse geçebildiği ve konjenital anomalilere, gebeliğin sonlanmasına ve diğer fetal sağlık sorunlarına yol açabildiği gösterilmiştir (Daud ve ark. 2015). Transport proteinlerinin ekspresyon ve etkinliği, gebelik dönemi, gebeliğe özgü hormon düzeyleri, büyüme faktörleri, kullanılan ilaç ve hastalık durumuna bağlı olarak değişebilmektedir. Dolayısıyla fetüsün bu ksenobiyotiklere maruziyeti; gebelik süresince transport protein ifade ve fonksiyonuna göre değişebilmektedir (Ni and Mao 2011). Transport proteinlerinin endojen regülasyon kapsamında progesteron ve östrojenin ABCB1 ve ABCG2'de ifade seviyesinde artışa neden olduğu; glukokortikoidlerin ise ilaç taşınmasının önemli kontrol mekanizması olduğu, uzun süreli deksametazonun plasental ABCB1A/P-gp ekspresyonunu arttırdığı, ABCG2/BCRP ekspresyonunu ise azalttığı gösterilmiştir (Han LW ve ark. 2018). Fetüs hedefli ilaç taşıma sistemleri (unilamelar ipozomlar) ve farmakolojik manipülasyonlar (p-glikoprotein baskılanması gibi) ilaçların fetüse daha fazla miktarda geçmesini sağlayan plasental transport proteinlerine yönelik yapılan uygulamalardır; ancak plasental transport proteinlerinin hedefleri ve işlevlerine yönelik çalışmaların sınırlı olmasına bağlı olarak uygulamalar da henüz yaygın değildir (Staud F ve ark. 2012b).

GEREÇ ve YÖNTEM

Plasenta örnekleri

Araştırmada Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde zamanında (38-42 hafta) canlı doğum yapan 25-35 yaş arası annelerden edilen plasenta örnekleri (n=60) ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Kliniği ile Ankara Çevresi kliniklerinde miyadında (58-63 gün) canlı doğum yapan (1-6 yaş) köpeklerden (n=25) (gebelik komplikasyonu, erken doğum, sistemik hastalıklar, düzenli aşılaması yapılmayan hayvanlar çalışma kapsamı dışında tutuldu) alınan plasenta örnekleri kullanıldı. Araştırma; Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Etik Kurul Onayı: 07.03.2019 tarih ve 2019-5-49 sayılı karar) ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (Etik Kurul Onayı: 20.02.2019 tarih ve 2019-5-49 sayılı karar) belirlemiş olduğu etik ve Helsinki Bildirgesi prensipleri göz önünde bulundurularak yapıldı. Örneklerin elde edilmesi ve bölümlendirme işlemi Şekil 1'de gösterildi.

GC-MS analizi

Örneklerin GC/MS analizi için hazırlanması, kirletici analizi için örneklerin ekstraksiyonu ve derivatizasyonu, GC/MS analizi için cihaz optimizasyonu ve validasyonu tamamlandı (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022).

RNA-Seq analizi

RNA izolasyonu için örnekler, sıvı azot içerisinde çıkarılarak, RNAaz ari şartlarda; GeneAll Hybrid-R (GeneAll, Güney Kore) kiti kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonunu takiben RNA konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile tayin edildi. Absorbans 260/280 oranı 2.0-2.2 arası olan örnekler çalışmaya dahil edildi, örnek kalitesi çalışmaya uygun düzeyde değil ise hastanın yedik örneğine dönüldü ve izolasyon işlemi tekrarlandı. Plasentadan RNA ekstraksiyonuna ilişkin köpeklerde herhangi bir kaynak bulunmamaktadır. İnsan örneklerinde yapılan araştırmalarda ise dokunun yapısı nedeniyle RNA bütünlüğünün çoğunlukla sağlanamadığı ve RNA degradasyonuna açık olduğu (kanda ve dokuda yüksek RNAaz aktivitesi bulunması nedeniyle) görülmektedir. Araştırmada da örneklerdeki ekstraksiyonlar ideal analizin yapılabilmesi için optimize edilmiştir (Şekil 2). İnsan plaseenta örnekleri (n=55) ile gerçekleştirilen RNAseq analizleri sonrasında biyoinformatik analizler Cancer Genomic Cloud üzerinden gerçekleştirildi. Ardından R program alt yazılımlarından DeSeq paketi kullanıldı.

In siliko

Moleküler yerleştirme simülasyonları ve konformasyonel analiz, Autodock Vina'nın web tabanlı sürümü Webina 1.0.3 kullanılarak yapıldı (Suemune ve ark. 2022). Test edilen ligandlar PubChem kimyasal veri tabanından SDF formatında, proteinler ise PDB formatında RCSB PDB (Research Collaboratory Structural Bioinformatics Protein Data Bank) veri tabanı kullanılarak indirildi.

In vitro

HTR8/SVneo (ATCC CRL-3271TM) hücre hattı L-glutamin ve 25mM HEPES, %5 FBS (Biological Industries, İsrail) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, İsrail) içeren RPMI 1640 (Biological Industries, İsrail) ortamında 37°C'de kültüre edildi. Hücre konfluensliği, Juli FL Live Cell Analyzer cihazında otomatik olarak hesaplandı (NanoEnTek Inc, Seul, Güney Kore).

PCB118, PCB101 ve B-HCH (12 seri seyreltme ile), ortam (negatif kontrol) ve Triton X ile inkübe edildi. 24 saatlik bir inkübasyonun ardından hücreler PBS ile nazikçe yıkandı, süpernatantlar çıkarıldı ve MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich,MO,USA) uygulandı. 540 nm'de absorbans, bir mikropłaka okuyucu (SpectraMax i3/i3x MultiMode Detection Platform,

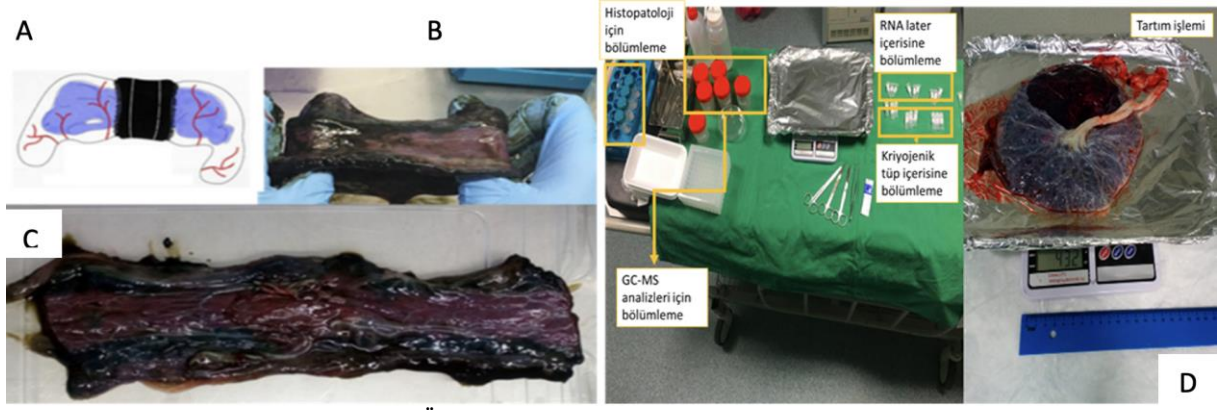
Molecular Devices, Sunnyvale, CA) kullanılarak ölçüldü ve toksisite yüzdesi, pozitif (Triton X) ve negatif kontroller (yalnızca orta) kullanılarak hesaplandı. IC50'yi hesaplamak için regresyon eğrisi. IC50, GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak hesaplandı.

qPCR analizi

2x10⁴ hücre, qPCR analizi için 6 kuyucuklu plakalarda PCB118, PCB101 ve B-HCH MTT tarafından belirlenen IC50/2 ve IC50/4 konsantrasyonları uygulanarak 24 s inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, qPCR adımları gerçekleştirildi. mRNA, üreticinin talimatlarına göre GeneAll kiti kullanılarak ekstrakte edildi. İlgili genlerin eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifikasyonu, cDNA, 500 nM ileri ve geri primer ve SYBR Green PCR Master Mix Buffer (BioRad, ABD) kullanılarak toplam 20µl hacimde üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi. Housekeeping gen olarak beta-aktin kullanıldı (Lan ve ark. 1. 2017). Döngü koşulları aşağıdaki gibidir: 95°C'de 2 dakika süreyle ilk denatürasyon, ardından 40 döngü 95°C 15's, sırasıyla ABCB1 için 62 °C, Beta-aktin için 62 °C ve SLC22a6 için 57 °C'de 15's ve 68°C 20's. Amplifikasyon için aşağıdaki primerler kullanıldı: ABCB1 + 5'-GTC TGG ACA AGC ACT GAA A-3', ABCB1- 5'-AAC AAC GGT TCG GAA GTT T-3', beta-aktin, + 5'-TGAAACGACTGGAGGTGGACA-3', rev CACGAGCTAAAGCCCTACTGC. SLC22a6 5'-CTCAGCTCCCGGAGCAACCCA -3', GCCCCCAGCCGCTGGGCTGGG. Real-time PCR amplifikasyonları, bir CFX96 Real-Time System (Biorad) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler iki kopya halinde yapıldı ve 7500 Software v2.0.6 ile analiz edildi. Referans gen olarak beta-aktin ve GAPDH (Arenas-Hernandez ve Vega-Sanchez 2013) kullanıldı.

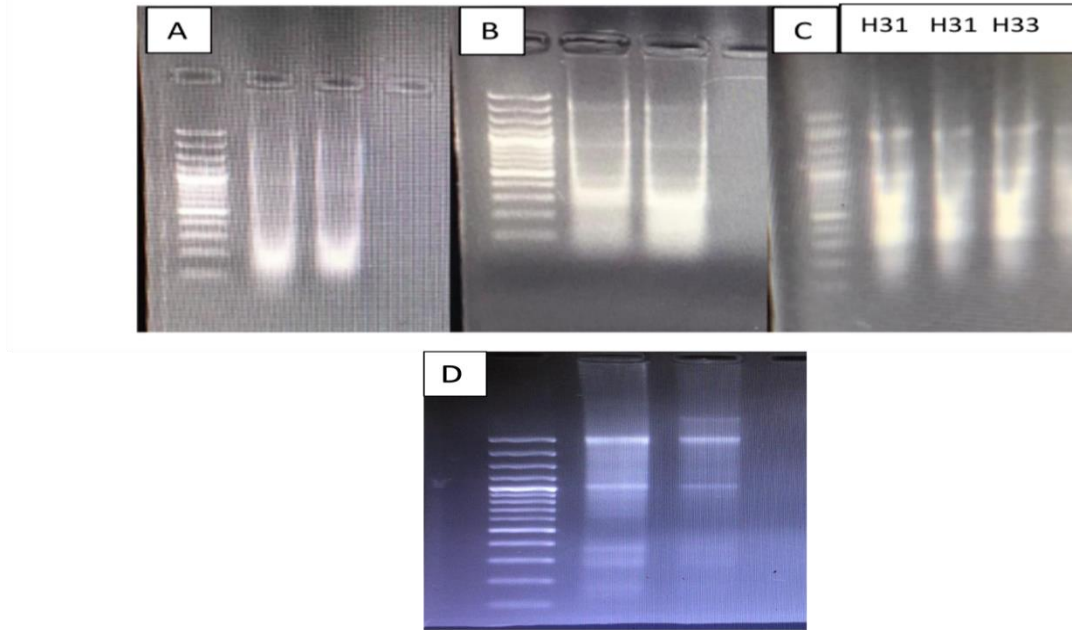
İstatistiksel analiz

Veri girişleri Microsoft Excel kullanılarak yapıldı. Sitotoksosite testlerinde IC50 değeri için GraphPadPrism 9.3.1 ve NCSS2007 yazılımları kullanıldı, en yüksek powera sahip eğri ile hesaplama tamamlandı. İstatistik analiz için SPS 11.00 sürümünden yararlanıldı. rtPCR bulguları delta-delta Ct metot kullanılarak değerlendirildi (Zhang, Ruschhaupt, and Biczok 2013). mRNA ifadesi kat değişimi ve ortalama standart sapma olarak verildi, farklı genlerin ifade karşılaştırılmasında ANOVA kullanıldı. P anlamlılık değeri <0.05 olarak kabul edildi. Biyoinformatik analizler için R3.1.1. yazılımı kullanıldı ve DAVID programının kendine ait alt istatistik verileri kullanıldı. Yolak analizi için Reactome yazılımı kullanıldı, FDR (Hochberg yanlış keşif oranı) değerlendirmeye alındı.



Şekil 1. Örneklerin elde edilmesi ve bölümlendirme işlemi

A. Köpek plasenta morfolojisi şematik gösterimi. B. Sezaryen operasyonu sonrası alınan köpek plasenta örneği (Ring) yüzük şeklinde görünümü. C. Plasenta yüzük morfolojisi açılmış hali. D. İnsan Plasenta Örneklerinin Bölümlendirme İşlemi



Şekil 2. RNA ekstraksiyon optimizasyonu için yapılan denemelere örnekler.

A. Doğrudan ekstraksiyon tamponuna konulan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı, B. Doğrudan ekstraksiyon tamponuna ve buz içerisinde çalışılan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı. C. Doğrudan beta mercaptoethanol (BME) eklenmiş ekstraksiyon tamponuna konulan ve buz içerisinde çalışılan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı. D. Doğrudan BME eklenmiş ekstraksiyon tamponuna konulan ve içerisinde örneklerin erimesi beklenilmeden disekte edildi H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı.

BULGULAR

GC-MS

Değerlendirilen 28 kirleticiden, hedef analitlerin birikimi türlere göre farklılık gösterdi. İnsan plasentalarındaki kontaminasyonun insidansı ve konsantrasyonu, doğum sayısı, yaş, çalışma durumu ve ızgara et tüketimi gibi belirli faktörlerden etkilenmedi ve köpeklerin daha yüksek atılım hızına sahip olduğu gösterildi. Plasenta için validasyon parametreleri uygun bulundu. Tüm katsayı verisi $>0,99$ idi. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik için hesaplanan tüm görece standart sapma değerleri (RSD) $< \%20$ idi. PCB 101, PCB118 ve β -HCH için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.48-1.45; 0.49-1.47; 0.63-1.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında bulundu.

Tümanalitler için geri kazanımlar $\%97.6-99$ arasında bulundu. Böylece ekstraksiyon yönteminin Eurachem Kılavuzuna uygun olduğu görüldü (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022). İnsan numunelerinde bir örnekte PCB101 826.400 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 23 örnekte ise PCB118 0.14 ile 41.9 arasında bulundu; köpek numunelerinde ise LOQ değeri üzerinde PCB kirleticisine rastlanmadı.

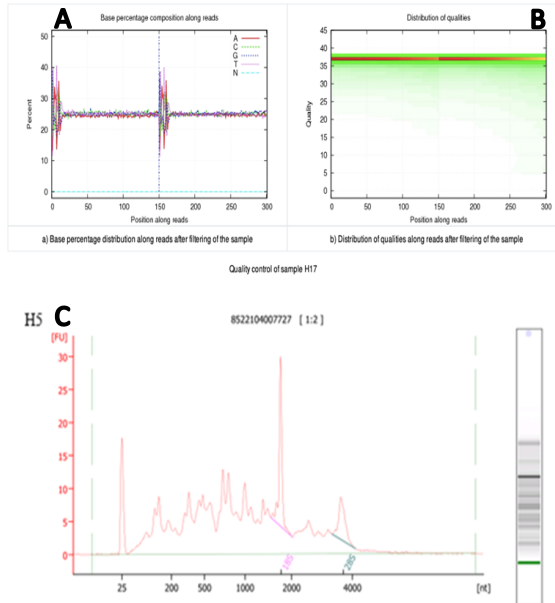
Tablo 1. Örneklerde pozitif çıkan ve in vitro analizlerde uygulanan analitler için validasyon parametreleri.

Kirletici	Linearite (µg/kg)	r2	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	G. K (%)	T.E (RSD%)	O.H (RSD%)
PCB101	5-100	0.994	0.48	1.45	97.9 ± 6.6	5.70	5.10
PCB118	5-100	0.993	0.49	1.47	97.6 ± 9.6	5.20	5.40

(Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022) (G. K: Geri Kazanım, T. E: Tekrar Edilebilirlik, O. H: Orta Hassasiyet).

Biyoinformatik

RNA ekstraksiyon optimizasyonunu takiben uygun kalitede ekstraktlar veya RNA örnekleri elde edildi. RIN (RNA Intact Number) değerleri 5.5 ile 7 arasında bulundu. Bu değer kabul edilebilir çalışma aralıklarında bulundu (Wolfe ve ark. 2014). Veri filtrelemede okumalar boyunca yer alan bazların yüzdesi ve kalite dağılımı ile analiz edilen baz kalite dağılımı örnekleri ile biyoanalizör jel sonucu örnekleri Şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. A. Numunelerin filtrenmesi sonrasında okumalarda yer alan bazların yüzde bileşimi. B. Numunelerin filtrenmesi sonrasında okumalarda yer alan kalite dağılımı. C. Analiz edilen baz kalite dağılımı örnekleri ile biyoanalizör (bioanalizer) jel sonucu örneği.

İnsan numunelerinde test edilen gruplar arasında, negatif numunelere kıyasla PCB pozitif grup için 742 genin farklı şekilde ifade edildiği gösterildi ($p < 0.05$). 742 gen içerisinde p değeri en düşük olan ilk 10 gen bölgesi Tablo 2'de gösterildi. Köpek numunelerinde PCB pozitif örnek bulunmaması nedeniyle inforamatik araştırma yapılmadı.

Tablo 2. PCB tespit edilen ve edilmeyen gruplarda p değerine göre fark görülen genler (ilk 10).

Gen adı	p	Kat değişimi
GYPC	0.00012	4.61
PAGE2	0.00012	6.03
SLC4A1	0.00013	5.66
RPS17	0.00014	4.37
GALNT3	0.00014	5.95
MAP1LC3C	0.00018	4.22
STC1	0.00018	5.06
GREB1L	0.00018	5.77
ALAS2	0.00027	5.17
CRHBP	0.00029	3.67

Araştırma konusu olan SLC için 14 gen ve ABC için 2 gende anlamlı farklılık bulundu (Tablo 3).

Tablo 3. PCB tespit edilen ve edilmeyen gruplarda ifade farklılığı bulunan SLC ve ABC genleri ($p < 0.05$).

GeneID	p	Kat değişimi
SLC4A1	0.00013	5.66
SLC38A5	0.00056	4.73
SLC25A12	0.0007	4.61
SLC30A8	0.0011	4.23
SLC14A1	0.0047	2.80
SLC15A1	0.0072	2.33
SLC39A10	0.0122	2.35
SLC33A1	0.0154	2.04
SLC25A6	0.0162	1.85
SLC22A18AS	0.0169	2.07
SLC25A37	0.0207	1.97
SLC31A1	0.0355	1.61
SLC6A12	0.0365	1.33
SLC4A4	0.0415	1.41
ABCA8	0.023	1.50
ABCC1	0.0253	1.66

İn siliko

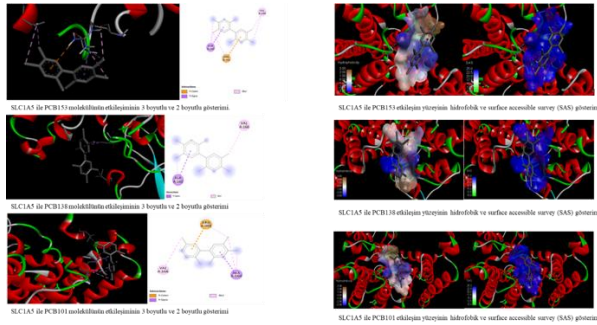
Birbirine ilgisi olan moleküllerin (önerilen çalışmada, kirleticiler ve hücre proteinleri) etkileşim süreçlerinin aydınlatılmasında Docking (moleküler kenetleme) analizi kullanıldı. Protein Data Bank ve ChemicalPub taramaları sonucunda, iki tane kararlı yapıda ve 3 boyutlu uzaydaki konformasyonu belli olan molekül elde edildi. Docking analizinde bu iki molekülün (protein-ligand etkileşimi) birbirleriyle olan ilişkisi incelendi. Ligandın proteinin hangi epitoplara hangi enerji değerleriyle bağlandığı tespit edildi. Bu bilgilerin ışığında hücre içine giren kirleticilerin hangi aday proteinlerle ve nasıl etkileştiklerine dair önemli bilgileri elde edildi.

Bu aşamada Swissdock (Grosdidier A ve ark. 2011) ve Autodock Vina programları kullanıldı.

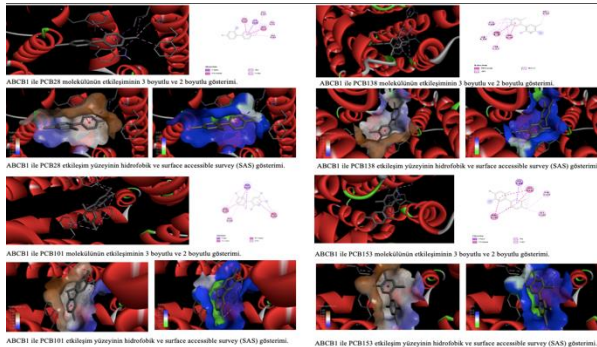
Protein-ligand etkileşimlerinin enerji değerleri üzerinden değerlendirme yapıldı. Etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri SLC için Şekil 4'te, ABCB1 için Şekil 5'te gösterildi. ABCB1 ile PCBlerin bağlanma afinitesi, SLC1A5'e göre daha yüksek bulundu. En yüksek bağlanma afinitesi PCB118 ile ABCB1 arasında bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Ligand-protein bağlanma afinitesi.

Ligand	Bağlanma Afinitesi
ABCB1_PCB28	-8.3
ABCB1_PCB101	-7.2
ABCB1_PCB138	-7.5
ABCB1_PCB153	-8.3
ABCB1_PCB180	-7.3
ABCB1_PCB118	-8.4
SLC1A5_PCB28	-3.2
SLC1A5_PCB101	-3.4
SLC1A5_PCB138	-3.4
SLC1A5_PCB153	-3.5
SLC1A5_PCB180	-3.5
SLC1A5_PCB118	-3.4



Şekil 4. SLC1A5 ile PCB153,138,101 arasında etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri.

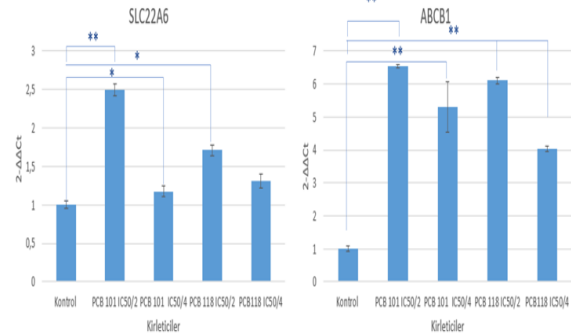


Şekil 5. ABCB1 ile PCB 28, 101,138, 153 arasında etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri.

qPCR

In vitro MTT sitotoksinite çalışmasında IC50 değerleri Pcb118 için 225 ve Pcb101 için 185 µg/ml olarak bulundu. IC50 dozunun alt dozları (IC50/2 ve IC50/4) ile transport genleri ifadesi için çalışıldı. ABCB1 ve SLC22A6 mRNA ifadeleri test edilen dozlarda (IC50/2 ve IC50/4 dozlarında) doza bağımlı

olarak arttı. En yüksek artış kontrole göre 6.54 mRNA ifadesinde artış ile PCB101 ve ABCB1 için bulundu (Şekil 6).



Şekil 6. PCB 101 ve PCB 118 uygulanan HTR8/SVneo'da SLC22A6 ve ABCB1 mRNA ifadesi. (* p<0.05, ** p<0.01)

TARTIŞMA

İnsan ve çevre sağlığını korumak, maruziyeti azaltmak için 2004 yılında yürürlüğe giren Stockholm Sözleşmesi kapsamında KOK'ların üretim ve kullanımı sınırlandırılıp yasaklanmasına karşın (PCB'ler, diklorodifeniltrikloroetan-DDT ve ana metaboliti diklorodifenil dikloroetan-DDE, polibromludifenileterler-PBDE, heksaklorobenzen-HCB), bu maddelerin kalıcılıklarına bağlı olarak toplumda düşük dozda KOK maruziyeti görülmektedir. Bu antropojenik bileşiklerden polibromlu difenil eterler poliüretan köpüklerin, mobilyaların, inşaat malzemelerinin, araba koltuklarının ve elektronik ekipmanların (cep telefonu, televizyon kumandası gibi) imalatında alev geciktirici katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu bileşikler ürün malzemelerine kovalent olarak bağlanamazlar ve materyal yüzeyinden ayrılabilirler için çevreye kolayca salınabilme özelliğine sahiptirler (Siddiği MA ve ark. 2003). Klorlu hidrokarbon bileşiklerden PCB'lerin 209 ayrı bileşiği (konjener) bulunur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından kanserojenik olarak (sınıf 1) sınıflandırılmış olup; reproduktif, gelişimsel ve endokrin bozucu etkinlik oluşturdukları bildirilmiştir. In utero maruziyet nedeniyle, bu maddelerden uzaklaşabilme imkanı olmayan; organ sisteminin, detoksifikasyon enzim ve diğer mekanizmaların işlevselliğini kazanamamış fetüs, popülasyon içerisinde en duyarlı gruptur. KOK maruziyetine bağlı olarak işlevselliği değişen ve bozulan membran transportları nedeniyle, bu maddelerin plasental bariyeri geçerek plasental kan dolaşımına geçebileceği bildirilmiştir. Yukarıda bahsedilen erişkin koroner arter ve diyabet hastalıklarına temel oluşturacak epigenetik (Reynolds R ve ark. 2013) ve glukoz metabolizmasında değişiklikler (Herbstman J ve ark. 2008) ile gestasyonel hipertansiyon ve preeklampsiye (Zhu Y ve ark. 2017) ek olarak KOK'ların fetüste; yapısal anomaliler, fonksiyonel eksiklikler, konjenital

neoplazi, büyüme geriliği (Triche E 2007), erken doğum (Padula A 2018) , in utero vitamin D yetersizliği (fetüste akciğer ve bağışıklık sistemi için kritik), sistemik enflamasyon (Yurdakök K, 2013) , düşük doğum ağırlığı (Vafeiadi ve ark. 2014), abortus (Kumar S, 2011) ve fetus ölümüne (Yang S ve ark. 2018) neden olabildiği gösterilmiştir. Prenatal PCB konsantrasyonunun, düşük doğum ağırlığına (yaşama gücü, diyabet ve kardiyovasküler sistem hastalıklarıyla ilişkili kronik hastalıklara etkilidir) sebep olduğu bildirilmiştir. (Debost-Legrand A ve ark. 2016). Ayrıca, prenatal PCB maruziyetinin gelişim gerilikleri (Hertz-Picciotto I, ve ark. 2005) , nörolojik gelişimsel gerilikler (Park H, ve ark. 2010), astım (Karmaus W, ve ark. 2008) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı plasental yapıya sahip insan ve köpeklerde farklı fonksiyona sahip olabilecek membran transport proteinleri ifadelerinin, kirleticilere bağlı olarak değişebileceği hipotezi araştırılmış ve bu proteinlerin fonksiyonu ve koruyucu özelliklerinin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Hem hayvan, hem de insan sağlığı için risk değerlendirmelerinin temelini oluşturan toksikokinetik çalışmalar için önemli bir altyapı oluşturması bakımından araştırma bulgularımız önem taşımaktadır.

Literatürde PCB ile membran taşıyıcı proteinler arasında ilişkiyi gösteren bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte halojenli hidrokarbonların membran taşıyıcı proteinlerin ifadesini etkileyerek ilaçların toksikokinetik, toksisite ve farmakokinetik etkinliğini değiştirdiği ortaya konmuştur (Fardel ve ark, 2011). Plasentada yoğun miktarda bulunan SLC ailesine ait taşıyıcı proteinlerden hENT1, FR α , ve SERT ve ABC protein ailesinden ABCB1, ABCG2, ABCC2 gen ifadelerinin PCB, PAH ve Fitalat gibi çevresel kirleticilerin bu proteinlere olan affiniteleri ile değişebileceği görülmüştür (Li ve ark. 2021). Çevresel PCB maruziyetinin Parkinson hastalığının etiolojisiyle ilgili mekanistik ilişkisini araştıran deneysel bir çalışmada, doza bağlı striatal dopamin taşıyıcı protein (SLC6A3) ifadesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Caudle, 2006); benzer bir bulgu transformatörlerde kullanılan ve yasaklanan PCB karışımı Araclor için de bulunmuştur (Bemis, 2004). Araştırmamızın biyoinformatik bulgularına göre, SLC6A3'e ilişkin anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Bunun, kontrol gruplarının sadece PCB maruziyetine göre ayrılmış olması, PCB ve kontrol gruplarında farklı kirleticilerin (pestisit, ağır metal, kalıcı organik kirleticiler, fitalat/adipat, diğer plastikleştiriciler gibi) bulunmasına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Proje kapsamında (119S702), gündelik maruziyete uygun şekilde çoklu organik kirleticiler çalışılmıştır (PBDE, PCB, organoklorlu pestisit, PAH gruplarında 28 kirleticiler), ancak bu araştırmada sadece PCB ile ilişkili değerlendirme yapılmıştır. Bulgularımız, çoklu organik kirleticilerin

transport proteinleri üzerine etkilerinin tekli maruziyetten farklı olabileceğini göstermektedir. RNA-Seq verilerine göre test edilen gruplar arasında, negatif numunelere kıyasla PCB pozitif grup için 742 genin farklı şekilde ifade edildiği gösterildi. Bu verilerin içinde farklı ifade edilen SLC22A6 ve ABCB1 genleri qPCR ve in siliko yöntemlerle desteklenerek plasentada saptanan PCB yükünün hücre membran transferinde sorumlu olan genlerin ifadelerinde değişime yol açtığı gösterilmiştir. KOK'ların organizmaya etkilerinin araştırılmasında, öncelikle bu bileşiklerin hücre içerisine alınmasını ve atılımını kontrol eden membran transportları ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda KOK'ların çoğunluğunun (DDT, DDE, DDD, dieldrin, endrin, PCB-146, PCB-170, PCB-187, PBDE-47 ve PBDE-100) P-gp gibi transportlarla etkileşime girerek, bu proteinlerin taşıma işlevini engellemek suretiyle normalde hücreden atılabilecek ksenobiyotiklere karşı canlıları duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Nicklisch SC ve ark. 2016). Araştırmamızda in siliko bulgularda PCBlerin bağlanma affinitesi ABCB1'de SLC'ye (SLC1A5) göre daha yüksek bulundu. ABCB1 mRNA ifadesi PCB101'in IC50/2 dozunda SLC22A6'ya göre 2,6 kat daha yüksek bulundu; PCB118 için ise bu fark 3,57 kat idi. PCB'lerin ABCB1 ifadesine etkisi çalışılan SLClere göre daha yüksek bulunmuştur. Araştırmamızın in siliko bulguları, in vitro bulgular ile paralellik göstermiştir.

SLC grubunda, sekans bulgularında en düşük p değerine sahip SLC4A1 geni tarafından kodlanan protein, anyon değiştirici (AE) ailesinin bir parçasıdır ve dokulardan akciğerlere karbondioksit taşınmasında rol oynayan bir klorür/bikarbonat değiştirici olarak işlev gördüğü eritrosit plazma zarında ifade edilmektedir. İkinci gen olan SLC38A5 tarafından kodlanan protein ise sodyuma bağlı amino asit taşıyıcısıdır. ABC transporterlarından ifadesi farklı olan ABCA8 geni tarafından kodlanmış protein, lipid metabolizmasını düzenlemede ve miyelinin oluşumu ile korunmasında görev alırken, ABCC1 tarafından kodlanan protein, substrat olarak oksitlenmiş glutasyon, sisteinil lökotrienler için organik anyon taşıyıcısı olarak işlev görür. Aynı zamanda steroid hormonlarının ve safra tuzlarının glukuronidlerini ve sülfat konjugatlarını da taşır (Genecards 2022). Araştırmamız bulgularında da gösterildiği üzere, plasentada kirleticilere bağlı transport proteinlerini kodlayan genlerde ifade değişiklikleri bulunmakta olup, fetal gelişim üzerine etkileri için deneysel in vivo çalışmaların yapılması için önemli bir alt yapı sağlamıştır.

SONUÇ

KOK maruziyetine bağlı, ksenobiyotiklerin transplasental olarak fetüse aktarılmasında plasental transport proteinlerinin ekspresyon miktarı ve fonksiyonu değişebilmektedir. Fetüsün kirleticilere karşı korunmasında ekspresyondaki değişiklikler büyük öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar plasentada kirletici miktarının tespitine veya plasental membran proteinlerinin deneysel koşullarda bir veya birkaçının maruziyetine bağlı ifadesinin araştırılmasına yönelik olup, gerçek maruziyet koşullarında etkileşimi ve bu etkileşimin yollarını kapsayan bir araştırma bulunmamaktadır. Araştırma kapsamındaki hem epidemiyolojik hem de deneysel bulgularımız, PCB maruziyetine bağlı özellikle ABCB1 ifadesinde artış olduğunu göstermektedir. Sekans bulgularında ifade artışı olan genlerin eş zamanlı farklı maruziyetlere bağlı olabileceği veya polimorfizmlerden kaynaklanabileceği düşünülse de in vitro bulgularımız bu değerlendirmemizi kuvvetlendirmektedir. ABCB1 artışı koryoamniyonit gibi enflamasyon durumu, gestasyon dönemi gibi fizyolojik faktörler veya maternal stresten de etkilenebilmektedir (Han, Gao, and Mao 2018). İlerleyen çalışmalarda, epidemiyolojik ve in vitro araştırmamızın bulgularının in vivo deneysel modellerde de teyit edilmesi amaçlanmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayımlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: BYD, AF. **Gereç ve yöntem ve veri toplama:** Hücre kültürü ve rt-PCR analizler RU, YT, BYD; insan plasenta örneklerinin toplanması ÖÖ, HTÇ; köpek plasenta örneklerinin toplanması HK, KKA; kromatografik analizler ÖK, ÜGB, AF; moleküler kenetleme: MAÜ; inforatik değerlendirme: ÇA; sekans optimizasyon: HÖS. **Veri analizi ve yorum:** RU, BYD, ÖK, HÖS. **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** BYD, AF, HÖS.

Finansal Destek

Bu çalışma TÜBİTAK 119S702 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Arenas-Hernandez, Marcia, and Rodrigo Vega-Sanchez. (2013). Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC research notes*, 6.1: 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-285>.

Bemis, Jeffrey C., and Richard F. Seegal. (2004). PCB-induced inhibition of the vesicular monoamine transporter predicts reductions in synaptosomal dopamine content." *Toxicological Sciences*, 80.2: 288-295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh153>.

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>.

Caudle, W. M., Richardson, J. R., Delea, K. C., Guillot, T. S., Wang, M., Pennell, K. D., & Miller, G. W. (2006). Polychlorinated biphenyl-induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine toxicity. *Toxicological Sciences*, 92(2), 490-499. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl018>.

Daud, Aizati NA, et al. (2015). P-glycoprotein-mediated drug interactions in pregnancy and changes in the risk of congenital anomalies: a case-reference study. *Drug safety* 38.7: 651-659. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0299-3>.

Debost-Legrand, A., Warembourg, C., Massart, C., Chevrier, C., Bonvallot, N., Monfort, C., ... & Cordier, S. (2016). Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environmental research*, 146, 207-217. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.01.005>.

Genecards. (2022). SLC4A1 Gene - GeneCards | B3AT Protein | B3AT Antibody. Genecards, the Human Gene Database. 2022.

Han, L. W., Gao, C., & Mao, Q. (2018). An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 14(8), 817-829. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1499726>

Herbstman, J. B., Sjödin, A., Kurzon, M., Lederman, S. A., Jones, R. S., Rauh, V., ... & Perera, F. (2010). Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environmental health perspectives*, 118(5), 712-719.

Hertz-Picciotto, I., Charles, M. J., James, R. A., Keller, J. A., Willman, E., & Teplin, S. (2005). In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology*, 648-656.

Karmaus, W., Osuch, J., Zhang, J., Mikucki, D., & Haan, P. (2008). Prenatal exposure to PCBs is related to asthma in female adult offspring. *Epidemiology*, 19(6), S128.

Lan, Xi, et al. "Bisphenol A exposure promotes HTR-8/SVneo cell migration and impairs mouse placentation involving upregulation of integrin-β1 and MMP-9 and stimulation of MAPK and PI3K signaling pathways." *Oncotarget* 8.31 (2017): 51507. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17882>

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 14(8), 543-560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>.

Ni, Z., & Mao, Q. (2011). ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(4), 674-685.

- Nicklisch, S. C., Rees, S. D., McGrath, A. P., Gökirmak, T., Bonito, L. T., Vermeer, L. M., ... & Hamdoun, A. (2016). Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. *Science advances*, 2(4), e1600001. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600001>.
- Padula, A. M., Huang, H., Baer, R. J., August, L. M., Jankowska, M. M., Jellife-Pawlowski, L. L., ... & Woodruff, T. J. (2018). Environmental pollution and social factors as contributors to preterm birth in Fresno County. *Environmental Health*, 17(1), 1-21.
- Pang, K. S., Rodrigues, A. D., & Peter, R. M. (2010). Enzyme-and Transporter-Based Drug-Drug Interactions. New York: Springer, 2010, 301-307. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0840-7>.
- Park, H. Y., Hertz-Picciotto, I., Sovcikova, E., Kocan, A., Drobna, B., & Trnovec, T. (2010). Neurodevelopmental toxicity of prenatal polychlorinated biphenyls (PCBs) by chemical structure and activity: a birth cohort study. *Environmental Health*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-51>.
- Reynolds, R. M. (2013). Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis—2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, 38(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.012>.
- Siddiqi, Muhammad Akmal, Ronald H. Laessig, and Kurt D. Reed. "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants—old diseases." *Clinical medicine & research* 1.4 (2003): 281-290. Staud, Frantisek, Lukas Cervený, and Martina Ceckova. "Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure." *Journal of drug targeting* 20.9 (2012): 736-763. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>.
- Suemune, Hironori, et al. "Crystal structures of a 6-dimethylallyltryptophan synthase, IptA: Insights into substrate tolerance and enhancement of prenyltransferase activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 593 (2022): 144-150. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.01.018>.
- Triche, E. W., & Hossain, N. (2007, August). Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. In *Seminars in perinatology* (Vol. 31, No. 4, pp. 240-242). WB Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2007.07.013>.
- Vafeiadi, Marina, et al. "Persistent organic pollutants exposure during pregnancy, maternal gestational weight gain, and birth outcomes in the mother-child cohort in Crete, Greece (RHEA study)." *Environment international* 64 (2014): 116-123. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2013.12.015>.
- Wakabayashi, K., Tamura, A., Saito, H., Onishi, Y., & Ishikawa, T. (2006). Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology. *Drug metabolism reviews*, 38(3), 371-391.
- Wolfe, L. M., et al. "Banking placental tissue: an optimized collection procedure for genome-wide analysis of nucleic acids." *Placenta* 35.8 (2014): 645-654. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.05.005>.
- Yang, Shaoping, et al. "Ambient air pollution the risk of stillbirth: a prospective birth cohort study in Wuhan, China." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221.3 (2018): 502-509.
- Yurdakok-Dikmen, B., Kuzukiran, O., Uyar, R., Boztepe, U. G., Çelik, H. T., Ozyuncu, O., ... & Filazi, A. (2022). Live in same region, respond differently: Canine and human response to pollutants in placental accumulation. *Chemosphere*, 301, 134470. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134470>.
- Yurdakök, K. (2013). Ambient air pollution and the fetus. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized* 2 (2): 1-6. <https://doi.org/10.7363/020232>.
- Zhang, J. D., Ruschhaupt, M., & Biczok, R. (2013). ddCt method for qRT-PCR data analysis. *Citeseer*, 48(4), 346-356.
- Zhu, Y., Zhang, C., Liu, D., Ha, S., Kim, S. S., Pollack, A., & Mendola, P. (2017). Ambient air pollution and risk of gestational hypertension. *American journal of epidemiology*, 186(3), 334-343. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx097>.



DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağlık Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1153667>



Arı ve Arı Ürünlerinde İlaç, Pestisit ve Metallerin Etkisi ve Kontaminasyonu

Mehmet ÖZÜİÇLİ¹

¹ Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 03.08.2022, **Kabul Tarihi / Accepted:** 16.09.2022

ÖZ

Bu çalışma insan tüketimine sunulan başta bal olmak üzere diğer arı ürünlerinde ilaç ve pestisit kullanımına ve metal kalıntıları ve arı sağlığına ilişkin Türkiye’de yapılan güncel çalışmalardan elde edilen bilgilerin derlenmesi amacıyla yapılmıştır. Arıcılık sektörü gerek ülkemizde gerek dünya çapında endüstrileşme yolunda hızla ilerleyen bir sektördür. Özellikle kırsal alanda yerleşim gösteren aileler açısından ek gelir olma yolunda hızla ilerlemektedir. Bal doğası gereği temiz ve sağlıklı olmalıdır. İnsan dahil diğer canlılarda olduğu gibi bal arılarında da viral, bakteriyel, fungal ve ektoparazitlere karşı çeşitli ilaçlar ve kullanımı yasak olmasına rağmen antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu yüzden ülkemizde ve dünyada başta bal olmak üzere arı ürünlerinde ilaç kalıntı sorunu yaşanmaktadır. Bu noktada gerek arı sağlığı gerek insan sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Bu durumun önüne geçilebilmesi için başta Veteriner Hekimler olmak üzere sağlık sektöründe çalışan insanlara büyük görevler düşmektedir. Her şeyden önce arıcılıkla ilgilenen üreticiler bilinçlendirilmeli, araştırmacılar bilinen ilaçlar yanında tedavide doğal tedavi yöntemlerini araştırarak bal arısı hastalıklarına karşı en uygun tedavi yöntemlerini bulma çalışmalarını hızlandırmalıdır. Bu çalışmalar gerek devlet gerekse özel sektör tarafından desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Arı sağlığı, Arı ürünleri, İlaçlar, Pestisitler, Kontaminasyon.

The Effect and Contamination of Drugs, Pesticides and Metals in Bee and Bee Products

ABSTRACT

This study was carried out in order to compile the information obtained from current studies in Turkey on the use of drugs and pesticides in other bee products, especially honey, and metal residues and bee health, which are offered for human consumption. The beekeeping sector is a sector that is rapidly advancing towards industrialization both in our country and around the world. It is rapidly progressing towards becoming an additional income especially for families located in rural areas. Honey should be clean and healthy by nature. As in other living things including humans, various drugs and antibiotics are used against viral, bacterial, fungal and ectoparasites in honey bees, although their use is prohibited. Therefore, there is a drug residue problem in bee products, especially honey, in our country and in the world. At this point, both bee health and human health are adversely affected. In order to prevent this situation, people working in the health sector, especially veterinarians, have great duties. First of all, producers who are interested in beekeeping should be made aware, and researchers should accelerate their efforts to find the most appropriate treatment methods against honey bee diseases by researching natural treatment methods in addition to known drugs. These studies should be supported by both the state and the private sector.

Keywords: Bee health, Bee products, Drugs, Pesticides, Contamination.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mehmet ÖZÜİÇLİ, Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye.

E-mail: mehmet.ozuicli@balikesir.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Özüiçli, M. (2022). Arı ve arı ürünlerinde ilaç, pestisit ve metallerin etkisi ve kontaminasyonu. *BAUN Sağlık Bil Derg.* 11(Supplement 1): 38-43.
<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1153667>



BAUN Health Sci J 2022 OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/pub/balikesirsbd>
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Bal arıları ekolojik dengenin stabil kalmasında ve insan beslenmesinde önemli yer tutan sosyal böceklerdir (Akyol ve Korkmaz, 2005). Türkiye zengin bitki faunası ve mevsim koşulları göz önünde bulundurulduğunda arıcılık faaliyetleri için çok uygun bir coğrafyadır. Ülkemiz Hindistan ve Çin'den sonra kovan miktarı bakımından dünyada üçüncü sıradadır (Burucu, 2022).

Ülkemizde kovan varlığı fazla olmasına rağmen verimlilik oldukça düşüktür ve ortalama bal verimi 14 kg civarındadır. Hindistan kovan sayısı bakımından dünyada lider konumdayken bal verimi ortalama 5.5 kg, ikinci konumda olan Çin'de ise ortalama bal verimi 48.9 kg'dır (Burucu, 2022).

Başta bal, propolis, polen, arı sütü, bal mumu gibi arı ürünleri özellikle kırsal alanda yaşayan aileler için önemli ekonomik katkı oluşturmaktadır. Türkiye, TÜİK verilerine göre 2021 yılında 95.000 ton bal üretimi ile Çin'den sonra ikinci sırada gelmektedir (Burucu, 2022). Kovan sayısı 2017 yılından 2021 yılına kadar artarken bal üretimi ise azalım göstermektedir. Bu ters orantının belli başlı nedenleri vardır. Bu nedenlerden başlıcaları arı zararlıları ve bu zararlılara karşı kullanılan pestisitlerin yanlış kullanımıdır (Burucu, 2022).

GENİŞLEME

Arı zararlıları

Diğer tüm canlılarda olduğu gibi bal arılarının sağlığını tehdit eden çeşitli hastalık etkenleri vardır. Bunlardan en önemlileri bakteriyel [*Paenibacillus larvae* (Amerikan Yavru Çürüklüğü), *Melisococcus pluton* (Avrupa Yavru Çürüklüğü), *Pseudomonas apiseptica* (Septisemi Hastalığı)], viral [IAPV (İsrail Akut Arı Felç Virüsü), CBPV (Kronik Arı Paraliz Virüsü), ABPV (Akut Arı Paraliz Virüsü), DWV (Deforme Kanat Virüsü), BQCV (Siyah Kraliçe Hücre Virüsü), KBV (Kaşmir Arı Virüsü), Sacbrood (Torba Çürüklüğü)] ve fungal [*Ascosphaera apis* (Kireç Hastalığı), *Aspergillus flavus* (Taş Hastalığı)], *Nosema apis* ve *N. cerenae* (Nosemosis)] kökenlidir (Özüüçli ve Aydın, 2018; Uygur ve Girişgin, 2008). Bal arılarının dünya genelinde en fazla gözlemlenen ve mücadelesinde en fazla çaba sarf edilen arthropod kaynaklı hastalığı Varroosis'tir. Bu hastalığın etkeni *Varroa destructor*'dür (Sırrı ve ark., 2006).

Son yıllarda hem bitkisel hem de arı ürünü miktarını arttırmak için çeşitli ilaç ve benzeri maddelerin kullanımı artmıştır. Bu durum bal arılarının ve arı ürünlerinin bu ilaç ve maddelere maruziyetini de arttırmıştır. Bu ilaçların bilinçsiz kullanımından dolayı kimyasallara karşı direnç şekillenmiş buna bağlı olarak kimyasalların etkinlikleri azalmıştır. Ayrıca ilaç kalıntılarının dolaylı hem arı hem insan sağlığı olumsuz bir şekilde etkilenmiştir. Ülkemizde ruhsatsız ilaç kullanımı oldukça yaygındır. Ruhsatlı ilaçların dozunun iyi ayarlanamaması ve nektar akımı döneminde kullanılmaları gibi durumlarda da arı ürünlerinde kalıntı sorunu karşımıza çıkmaktadır. En

önemli ve ihbarı mecburi bal arısı hastalıklarından olan Amerikan yavru çürüklüğünde kullanımı yasak olmasına rağmen antibiyotik kullanımına gidilmekte ve bu durumlarda da balda antibiyotik kalıntısı şekillenmektedir. Bu yüzden son yirmi yılda bal ihracatında en önemli noktalardan bir tanesi de balda antibiyotik kalıntısı olmuştur (Derebaşı ve ark., 2014; Saygılı, 2017).

Arı zararlılarında kullanılan kimyasal maddeler Antibiyotikler

1997 yılında balda yapılan analizlerde streptomisin bulunmasıyla bal analizleri daha komplike bir şekilde yapılmaya başlanmıştır (Filodda ve ark., 2002). Çevre ve bakım kaynaklı nedenlerden dolayı arı ürünlerinde arı ilaçları ve pestisit kontaminasyonu meydana gelmektedir. Bakım kaynaklı kontaminasyonu bal arısı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar oluştururken, ağır metaller, radyoaktif maddeler ve mikroorganizmalar ise çevresel kontaminasyon kaynaklarını oluşturur (Bogdanov, 2006). Avrupa Birliği kriterlerine göre maximum kalıntı limitleri belirtilmemiş ilaçlar için limit 10 mg/kg'dır (Martin ve ark., 2002).

Arı ürünlerinde, hastalık sağaltımı için kullanılan ilaçlar ve bal arılarının nektar ve polen topladıkları bitkilerde zirai mücadele için kullanılan insektisitler kontaminasyon nedenleridir (Bal Tebliği, 2005). Dünyada çoğu ülkede arı hastalıklarında antibiyotik kullanımı yasaklanmasına rağmen İsviçre, İngiltere, Belçika gibi ülkelerde antibiyotik kullanımına 0.01-0.05 mg/kg doz aralığında izin verilmektedir (Seğmenoğlu ve Baydan, 2012). Kullanılan antibiyotikler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yavru çürüklüklerinde kullanılabilen antibiyotikler.

Antibiyotikler	
Sülfanamidler	Sülfathiazol, sülfamerazin, sülfamethazin, sülfamethaksazol, sülfadiazin, sülfanilamid sülfamethokspiridazin, sülfadoksin, sülfadimidin,
Aminoglikozidler	Streptomisin, dihydrostreptomisin
Tetrasiklinler	Tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin
Fenikoller	Kloramfenikol
Makrolitler	Tylosin, eritromisin
Beta-laktamlar	Penisilinler
Nitrofuraneler	AOZ, SC. (AOZ: 3-amino-2oksazolidinon; SC: semikarbazid)

Türkiye'de bal numuneleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada bal numunelerinin %25'inde sülfadimidin, tetrasiklin ve streptomisin gibi ilaçlardan en az birine rastlanmıştır. Ballarda en çok tespit edilen antibiyotik grupları sülfonamid ve

tetrasiklinler olmuştur. Balların %90'ında 10-11 ppb sulfadimidine, 13.65 ppb oranında tetrasikline rastlanmıştır. Streptomisin ise 10 ppb'den daha düşük tespit edilmiştir (Olaitan ve ark., 2007). Bir diğer çalışma Ege bölgesinde yapılmıştır. Bu bölgeden 103 bal örneği toplanmıştır. Analizi yapılan bal örneklerinde %23sülfonamid grubu antibiyotikler tespit edilmiş; pozitif bulunan örneklerin %68'si sülfametazin, %12'si sülfamerazin, ve %20'si sülfametoksazol olarak tespit edilmiştir (Uludağ, 2008). Bal üreticilerinden alınan 600 adet ve marketten alınan 10 adet bal örneği üzerinde yapılan çalışmalarda %29.5 oranında sülfonamid, %3.3 oranında tetrasiklin, %11.9 oranında streptomisin kalıntıları tespit edilmiştir (Gül, 2008). Karadeniz Bölgesi'ni kapsayan bir çalışmada da 209 petekli bal üzerinde çalışma yapılmıştır. 13 adedinde streptomisin, 59 adedinde sülfonamid ve 7 adedinde de tetrasiklin tespit edilmiştir (Derebaşı ve ark., 2014). Petek örnekleri üzerinde Kırklareli ilinde yapılan çalışmada herhangi bir antibiyotik kalıntısına rastlanılmamıştır. Süzme bal örneklerinde ise numuların %58.3'nde tetrasiklin tespit edilmiştir (Saygılı, 2017). Muğla'da yapılan bir çalışmada Sülfametazin 84 örneğin tamamında tespit edilmiştir. Avrupa Birliği ilaç kalıntılarıyla ilgili yönetmelik çıkarmış ve bu yönetmelik ilgili bakanlığımızca kabul edilip yürürlüğe koyulmuştur. Maximum Kalıntı Limiti (MKL) belirtilmemiş antibiyotik ilaç kalıntılarının 0,01 mg/kg (10 ppb) değerini aşmaması gerektiği belirtilmiştir. Tetrasiklin kalıntılarının bu limitlerde olduğu, sülfametazinin ise 17 örnekte (%20.2) limit üstünde olduğu tespit edilmiştir (Bağcı, 2019).

Tablo 2. Kullanılan akarisitlerin kalıntı miktarları.

Aktif Madde	Uygulama başına aktif madde miktarı (mg)	Bal hasadından sonra uygulama zamanı	En yüksek kalıntı miktarı (mrl)**(mg/kg)
Bromopropylate	1.600	Sonbahar	0.1
Coumaphos	32	Sonbahar, Kış	0.05
Fluvalinate	1.600**	Ağustos, Eylül	0.05
Flumethrine	14.4*	Ağustos, Eylül	0.005

*Toplam aktif maddenin küçük bir kısmı (yaklaşık %5-10) **MRL İsviçre için.

Tablo 3. Propoliste akarisit kalıntısı (mg/kg).

Kalıntı	Bromopropylate	Fluvalinate	Flumethrine
Ortalama	1.17	9.8	2.54
En düşük	0.6	0.5	1.3
En yüksek	3.8	38.7	3.7

Varroa kontrolü için kullanılan etken maddeler

Bal arısı zararlılarında kullanılan ilaçlar talimatnamelerine uygun bir şekilde kullanılmadığı takdirde bal, polen, propolis ve arı sütünde kalıntı sorunu ortaya çıkmaktadır. Varroosis hastalığına karşı kullanılan ilaçların çoğu lipofilik karakterdedir ve bu yüzden uçuculuk özellikleri yoktur. Uzun süreli ve sık kullanımlarında arı ürünlerinde kalıntıya neden olurlar. Bal mumu yüksek absorpsiyon özelliğine sahiptir ve genellikle kullanılan ilaçlar bu özelliğinden dolayı bala bal mumundan karışır. Bal mumundan bala karışan ilaçların kalıntıları tolerans limitlerini aşıyorsa bu petekli balların tüketimi sakıncalı olabilir (Polat ve ark., 2020). Bal, petek ve propolisteki akarisit kalıntı miktarlarını belirlemek için İsviçre'de çalışma yapılmış ve kalıntı miktarları Tablo 2'te gösterilmiştir (Polat ve ark., 2020).

Bromopropylate, coumaphos, fluvalinate, malathion, diazinon, chlordimeform ve cymiazole gibi lipofilik maddeler arı ürünlerinde en sık tespit edilen etken maddeler olmuştur. Yapılan çalışmalarda bal mumu numunelerinin %90'ında bu maddelerin varlığı tespit edilmiştir (Polat ve ark., 2020). Propolis akarisit kullanımından en çok etkilenen arı ürünlerinden bir tanesi olmasına rağmen bu konuda yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Propolisin akarisitlere karşı hassas olduğu ve yağda eriyen akarisitlerin propolisi yüksek düzeyde etkilediği gözlemlenmiştir. Bu sınırlı çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 3'teki gibidir (Polat ve ark., 2020).

İmidacloprid, thiamethoxam, clothianidin gibi neonikotinoid grubu ilaçların kullanımı bal arısı hastalıklarında yasaklanmıştır (Karahan, Kutlu, ve Karaca, 2018). Tarım zararlılarına karşı kullanılan pestisitler tarlacı arı faaliyetleri tarafından kovanlara nektar ve polen vasıtası ile getirilmekte ve bu durum kovan içindeki diğer bireyleri de olumsuz etkilemektedir (Karahan ve Kutlu, 2017). Bunun yanında zirai mücadelede kullanılan pestisitler su kaynaklarını da kontamine etmekte ve bu kontamine olmuş sularda tıpkı polen ve nektarda olduğu gibi tarlacı arılar tarafından kovana getirilmekte ve bunun sonucunda arı sağlığı olumsuz etkilenmektedir (Polat ve ark., 2020). Pestisitler bal arıları tarafından temas, solunum ve oral yolla alınabilmektedir ve toksikasyonlar şekillenmektedir. Pestisitlerin bal arıları üzerindeki toksisitesi farklı parametreler tarafından belirlenmektedir. Bu parametreler; pestisit formülasyon özelliği, suda ya da yağda çözünürlüğü, bal arılarının fizyolojik ve davranışsal özellikleridir. Bunların yanında pestisit uygulandığı andaki sıcaklık ve ışık gibi faktörler de toksisite üzerinde etkilidir (Devillers, 2002). Yapılan bir çalışmada toz formülasyondaki pestisitlerin sıvı formülasyondaki pestisitlere oranla bal arılarında daha toksik olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni bal arılarının üzerinde bulunan setaların toz formülasyonda uygulanan pestisitler için tutunma olanağı sağlıyor olabileceği olarak açıklanmıştır (Johansen, 1983). Pestisitlere karşı duyarlılıkta detoksifikasyon işleminden sorumlu (sitokrom P450 monooksijenaz) enzimi bal arılarında diğer artropodlara nazaran daha azdır. Buna bağlı olarak bal arıları pestisit detoksifikasyonunu diğer artropodlara oranla daha az bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Bu durum pestisitlere karşı fizyolojik farklılığın duyarlılıkta etkili olabileceğini göstermektedir. (Hardtsone, ve Scott, 2010). Bal arılarında zehirlenme vakalarında kovan önünde ölü arıların bulunması tipik bir görünümdür. Arı ölümleri zehirlenmelere bağlı olarak olabileceği gibi biyolojik siklusun doğal bir parçası olarak ta gerçekleşebilir. Arı ölümlerinin takibi için kullanılacak bilgiler Tablo 4'te özetlenmiştir (Yıldız ve ark., 2005).

Tablo 4. Arı ölümlerinin takibiyle ilişkili indeks değerleri.

Arı ölümü	Değerlendirme
0-100 arı/gün	Normal Ölüm
200-400 arı/gün	Düşük Ölüm
500-900 arı/gün	Orta Ölüm
1000'den fazla	Yüksek Ölüm

Bal arılarında kullanılan ilaçlar diğer pestisitlerle (fungisit, herbisit, akarisit) sinerjik etki

oluşturabilmektedir. EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) sunduğu bir raporda fungusitler ve insektisitler (neonikotinoid ve sentetik piretroid) arasında sinerjizm olduğunu bildirmişlerdir (Thompson, 2012). Pestisitler bal arıları üzerinde ani ölümlerle ortaya çıkan akut toksikasyonlara neden olabildikleri gibi kronik toksikasyonlara da neden olabilirler (Ünal ve ark., 2010; Desneux ve ark., 2007; Oruç ve ark., 2020). Bu durumlar karşımıza çeşitli klinik bulgularla ortaya çıkabilmektedir. Yapılan bir çalışmada pestisit kalıntısı bulunan peteklerde gelişim süresinin kalıntı olmayan peteklere oranla daha fazla olduğunu ve pestisit kalıntısı olan peteklerde yetişen bal arısı bireylerinin ortalama ömrünün dört gün kısalacağını ortaya koymuştur (Thompson, 2012). Ayrıca pestisit kalıntılarının maruz kalan bal arılarının davranışsal özellikleri ve salgı bezleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Karahan, 2018). Neonikotinoid etken maddeler (imidacloprid ve clothianidin) üzerine yapılan çalışmalarda bu etken maddelere maruz kalan bal arılarının uçuş çapının ve çiçekli bitkilere uğrama sıklığının azaldığı tespit edilmiştir (Polat ve ark., 2020). Fipronil, thiamethoxam ve acetamiprid etken maddeleri üzerine yapılan bir çalışmada bu etken maddelere maruz kalan bal arılarının koku hafızalarının azaldığı ve buna bağlı olarak nektar ve polen kaynaklarına yönelim gösteremedikleri belirlenmiştir (Aliouane ve ark., 2009). Yapılan diğer bir çalışmada bal arılarına in vivo koşullarda şurup içerisinde imidocloprid etken maddesi verilmiştir. Bu etken maddeye maruz kalan bal arılarının arı sütü salgılayan hipofarengal bezlerinin kontrol grubuna oranla ciddi bir şekilde küçük olduğu gözlemlenmiştir (Hatjina ve ark., 2013).

Türkiye'de pestisit kullanımı

Ülkemizde Antalya, Mersin, Adana, Şanlıurfa gibi ülkelerde pestisit kullanımı 3 kg/ha kadar olmasına rağmen ortalama 2 kg/ha'dır. Ülkemizde 2018 yılında 59.000 ton pestisit kullanılmıştır. Pestisit türüne göre kullanım oranları %41 fungusitler, %22 herbisitler, %21 insektisitler, %5 akarisitler ve %11 diğerleri şeklindedir. Bölgelere göre pestisit kullanım oranları %29 Akdeniz Bölgesi, %19 Güney Doğu Anadolu Bölgesi, %18 İç Anadolu Bölgesi, %16 Marmara Bölgesi, %14 Ege Bölgesi ve %4 Karadeniz Bölgesi şeklindedir. Tablo 5'te ise arı ölümleri gözlemlenen bölgelerde en çok kullanılan pestisitler özetlenmiştir (Ergün ve Altıntaş, 2022).

Arılarda pestisit zehirlenmelerinde gözlemlenen klinik bulgular ve Türkiye'de pestisit zehirlenmeleri

Bal arılarında toksikasyon durumlarında çeşitli klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında kovan önünde 500-1000 arası günlük arı ölümü, anormal hareketler, felç tablosu, denge kaybı, uyuşukluk, sersemlik, kovan girişini bulmakta güçlük çeken arılar en önemli klinik bulgulardır (Oruç ve ark., 2020). Türkiye'de 2007 ve 2018 yıllarında Trakya Bölgesinde, Adana'da 2013 ve 2018 yılları arasında,

2018'de Şanlıurfa'da Harran ovasında bal arısı ölümleri gözlemlenmiştir. Adana'da 530 arılıklıta 141.606 kovandan 117.556 kovan çeşitli toksikasyonlardan dolayı zarar görmüştür.

Pestisit zehirlenmelerine karşı koruma doğru teşhis/tanı

Bu bağlamda yapılması gereken en önemli nokta pestisit sorunlarıyla ilgilenen laboratuvar ve uzman personel ihtiyacının hızla giderilmesidir. Bunun yanında hedef pestisitlerin iyi belirlenmesi, olay yerinde inceleme, numunelerin doğru alınması ve uygun şartlarda en hızlı şekilde laboratuvarlara gönderilmesi, konu uzmanlarının bir araya gelerek konuyu detaylı bir şekilde çalışmalarınıdır.

Balda metal içerik

2007 yılında Yarsan ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada balın elde edildiği çevreye ait kontaminasyon için bir biyoindikatör olduğunu belirtmişler ve Türkiye'nin altı farklı bölgesinden gelen 45 bal örneğini (Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, ve Zn) metal içerikleri yönünden incelemişlerdir. Alüminyum en çok çıkan metal olmuştur (7.21–19.12 ppm arasında). Çinko (1.15–14.52 ppm) ve demir (1.30–11.29 ppm) aralığında tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak bal arısı yetiştiriciliği yapılan bölgeler yerleşim ve kara yollarından en az beş km mesafe uzaklıkta olmalıdır. Böylelikle çevreden bala karışabilecek metallerin önüne bir noktaya kadar geçilmiş olur (Yarsan ve ark., 2007).

Tablo 5. Arı ölümlerinin olduğu bölgelerde en çok kullanılan pestisitler.

İnsektisitler	Fungisitler	Herbisitler	
Tiyakloprit	Tebukonazol	Glifosat Potasyum T.	Klorsülfuron
Asetamiprit	Mankozeb	Aklonifen	Dimethenamid
Azadiraktin	Azoksistrobin	Tribenuron-Metil	Asetoklor
Malatyon	Propined	İsooktil Ester	Dimethenamid-P
Lambda-sihalotrin	Maneb		
Tau-Fluvalinat	Kaptan % 50		
	Fosetil-Alüminyum		

SONUÇ

Tarım arazilerinde pestisit kullanılması kaçınılmazdır. Bitkisel üretim yapılan alanlara yakın bölgelerde arı yetiştiriciliği yapılması bal arılarında pestisit zehirlenmelerine neden olmaktadır. Çiftçiler ve arı yetiştiricilerinin yeterli bilgiye sahip olmamaları, aralarında koordinasyon eksikliği, kamu ve akademik çalışanların yeterli bilgiye sahip olmaması ya da sahip olsalar bile bu bilgileri aktarabilecekleri ortamın olmaması, yasal uygulamaların yeterli olmaması, arı birliklerinin bilgi ve yönlendirmede yetersiz kalmaları, ruhsatsız ilaçların kullanımı bal arılarında pestisit zehirlenmelerine neden olan önemli noktalar. Pestisit kullanımına bağlı olarak şekillenen bal arısı ölümlerini minimum düzeyde tutmak için çiftçiler, bal arısı yetiştiricileri, arı birlikleri, akademik personel ve pestisit üreten firmalar koordineli bir şekilde çalışmalıdırlar. Bal arısı yetiştiriciliği tarım arazilerinden en az beş km çapta uzakta yapılmalıdır. Zirai mücadele yapılmadan önce kullanılacak kimyasalın özellikleri hem arı yetiştiricilerine hem de çiftçilere detaylıca anlatılmalıdır.

Bal arılarının su ihtiyaçlarını karşıladıkları kaynakların pestisitlerle kontaminasyonunun önüne geçilmelidir. İlaçlamalar akşam üzeri ya da sabah erken saatlerde arıların uçuş zamanı haricindeki saatlerde yapılmalıdır. İlgili kamu kurumları tarafından resmi kontrol ve denetimlerin etkin ve

sürekliliği bir şekilde yapılmasına dikkat edilmelidir. Üniversitelerde arı hastalıkları, arı yetiştiriciliği vb. konularda eğitim verilerek, konu üzerinde uzman personelin yetiştirilmesine çalışılmalıdır. Sonuç olarak bal arısı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar ve tarım ürünlerinde kullanılan pestisit üzerine yapılan bilimsel çalışmaların ortak paydası, bu ilaçların arı sağlığı ve arı ürünleri için bir tehdit unsuru olabileceğini ortaya koymaktır.

Çıkar Çatışması

Bu yazar makalede herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Yazar Katkısı

Plan, tasarım: M.Ö; Gereç, yöntem ve veri toplama: M.Ö; Veri analizi ve yorum: M.Ö; Yazım ve değerlendirme: M.Ö.

KAYNAKLAR

- Akyol, E., & Korkmaz, A. (2005). Bal arısı (*Apis mellifera*) zararlısı *Varroa destructor*'un biyolojisi. *Uludağ Bee Journal*, (5): 122-127.
- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., & Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(1), 113-122.

- Bağcı, H. (2019). *Muğla bölgesinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntılarının araştırılması*. [Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, Tez No: 2019-022]
- Bal Tebliği. (2005, 17 Aralık). *Resmî Gazete* (Sayı:26026). <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/12/20051217-9.htm>
- Bogdanov, S.T. (2006). Contaminants of Bee Products. *Apidologie*, 37, 1–18.
- Burucu, V. (2022). Arıcılık Ürün Raporu. *Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü Tepe*, Tepe Yayın No: 351, ISBN: 978-625-8451-37-5.
- Derebaşı, E., Bulut, G., Col, M., Güney, F., Yaşar, N., & Ertürk, Ö. (2014). Physicochemical and residue analysis of honey from black region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(1): 10-17.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81-106.
- Devillers, J. (2002). The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In *Honey Bees* (pp. 15-25). CRC Press.
- Ergün, H., & Altıntaş, L. (2022). Pestisitlerin Arı Yetiştiriciliğine Etkisi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 13(1), 26-46. <https://doi.org/10.38137/vftd.1075708>.
- Filodda, F., Kirsch, R., Smidt, J., & Tüchel, P. (2002). Use of antibiotics in the production of honey—Risks and perspectives for the honey importers and honey industry, preventing residues in honey. APIMONDIA Symposium, 10–11. Oct. Celle. Germany.
- Gül, A. (2008). *Türkiye’de üretilen bazı balların yapısal özelliklerinin gıda güvenliği bakımından araştırılması*. [Doktora Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay, 251]
- Hardtson, M. C., & Scott, J. G. (2010) Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Management Science*, 66(11): 1171-1180. <https://doi.org/10.1002/ps.2001>.
- Haçjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., & Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, 44(4), 467-480.
- Johansen, C. (1983). Protecting bees from pesticides. *Proceedings of the 5th International Symposium on Pollination*, Versailles (France), 155- 161.
- Karahan, A., & Kutlu, M. (2017). Arılar ve Pestisitler. *Petek Dergisi*, (3): 26-27.
- Karahan, A., Kutlu, M. A., & Karaca, İ. (2018). Thiacloprid’in Bal arılarının yön bulma davranışına etkileri, Effects of Thiacloprid’s Honey bees’ sense of direction. *6th International Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress*, Muğla– Turkey, 78-83, e-ISBN: 978-605-66673-2-9.
- Martin, P., Chem, C., & Chem, M.A. (2002). Imports into the EU from third countries, veterinary and other requirement, European Federation of Honey Packers and Distributors. Third Caribbean Beekeeping Congress. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.132.2429&rep=rep1&type=pdf>
- Olaitan, P. B., Adeleke Olufemi, E., & Ola Iyabo, O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3): 159-165.
- Oruç, H. (2019). Pestisitlerin Bal Arıları Üzerine Etkisi ve Korunma. Zehirsiz Sofralar Konferansı, İstanbul Kadir Has Üniversitesi, <https://zehirsizsofralar.org/wp-content/uploads>
- Oruç, H. H., Çaycı, M., & Sariyev, R. (2020). Sudden and Prevalent Deaths of Foraging Honey Bees in Early Spring During Sowing of Clothianidin Coated Maize Seeds Between 2013 and 2018 in Turkey. *Journal of Apicultural Science*, 64(1), 67-76. <https://doi.org/10.2478/jas-2020-0007>.
- Özüüçli, M., & Aydın, L. (2018). Türkiye Bal Arılarında Ciddi Tehlike; Nosemosis. *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 37(2): 35-40. <https://doi.org/10.30782/uluvfd.419001>.
- Polat, B., Özüüçli, M., Çetin, H., & Aydın, L. (2020). Pestisit kullanımının bal arısı sağlığına ve ürünlerine etkisi. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 39(2), 128-134.
- Saygılı, M. (2017). *Kırklareli ilinde arıcılık faaliyeti yapan üreticilerden toplanan peteklerde antibiyotik ve pestisit kalıntısı aranması*. [Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ] Erişim adresi: <http://acikerisim.nku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.11776/2342>.
- Seğmenoğlu, M. S., Baydan, E. (2012). Ballarda Rastlanabilen İlaç Kalıntıları ve Bulaşanlar. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 24-28.
- Sırrı, K., Nesim, K., Güven, E., & Karaer, Z. (2006). Yeni Geliştirilen Tespit Kabı ile Ergin Arılarda Varroa Enfestasyonunun Belirlenmesi. *Uludağ Bee Journal*, (2):68-73.
- Thompson, H. M. (2012). Interaction between pesticides and other factors in effects on bees. *Efsa Supporting Publications*, 9(9). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.EN-340>.
- Uludağ, R. (2008). *Ege bölgesinde tüketime sunulan ballarda sülfonamid kalıntılarının araştırılması*. [Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın] Erişim adresi: http://adudspace.adu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/11607/211/3/ramazan_uluda%C4%9F_tez.pdf.pdf
- Ünal, H. H., Oruç, H. H., Sezgin, A., Kabil, E. (2010). Determined pesticides after honey bee deaths between 2006 and 2010 in Turkey. *Uludağ Bee Journal*, 10(4):119-125.
- Uygur, Ş. Ö., & Girişgin, A. O. (2008). Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Uludağ Bee Journal*, 8(4): 130- 142.
- Yarsan, E., Karacal, F., İbrahim, I. G., Dikmen, B., Koksal, A., & Das, Y. K. (2007). Contents of some metals in honeys from different regions in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(3), 255-258.
- Yıldız, M., Gürkan, O., & Turgut, C. (2005). Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. *TMMOB Ziraat Mühendisleri*, 6: 3-7.



DERLEME / REVIEW

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159940>



Hünnap (Ziziphus jujuba) Meyvesinin Biyolojik Etkinliği ve Kimyasal Bileşimi

Serkan KORKUT ¹, Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI ¹,
Adnan Adil HİŞMİOĞULLARI ²

¹ Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı

² Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 09.08.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 13.09.2022

ÖZ

Hünnap (Ziziphus jujuba), meyve ve ilaç olarak uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Biyolojik olarak etkin olan ana bileşenleri C vitamini, fenolik bileşikler, flavonoidler, triterpenik asitler ve polisakkaritlerdir. Hünnap meyvelerinin birçok fitokimyasal incelenmesi sonucunda; antikanser, anti-inflammatuvar, anti-obezite, immunstimülan, antioksidan, başta karaciğer olmak üzere, gastrointestinal ve sinir sistemlerini korumak gibi önemli biyolojik etkilere sahip oldukları gösterilmiştir. Bu derleme, hünnapın biyo-etkin özelliklerini örnek çalışmalarla açıklamayı amaçlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Hünnap, Diyabet, Antioksidan.

Biological Activity and Chemical Composition of Jujuba (Ziziphus jujuba) Fruit

ABSTRACT

Jujuba (Ziziphus jujuba) has a long history of usage as a fruit and remedy. The main biologically active components are vitamin C, phenolics, flavonoids, triterpenic acids, and polysaccharides. Many phytochemical studies of jujuba fruits indicate that Z. jujuba has important biological effects, such as the anticancer, anti-inflammatory, antiobesity, immunostimulant, antioxidant, hepatoprotective, neuroprotective and gastrointestinal protective activities. This review aims to explain bioactive characteristics of Z. jujuba by several examples of studies.

Keywords: Jujuba, Diabetes, Antioxidant.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Serkan KORKUT, Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Balıkesir, Turkey

E-mail: korkut008@hotmail.com.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Korkut, S., Hişmioğulları, Ş. E., & Hişmioğulları, A. A. (2022). Hünnap (ziziphus jujuba) meyvesinin biyolojik etkinliği ve kimyasal bileşimi. *BAUN Sağ Bilg Derg*, 11(Supplement 1): 44-50. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159940>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Hünnap, biyolojik olarak etkin bileşenleri sayesinde tarih boyunca çeşitli coğrafyalarda şifa kaynağı olarak kullanılmıştır. Geleneksel Çin tıbbında hünnap; diyabet, sindirim bozuklukları, diyare, cilt enfeksiyonları, karaciğer ve idrar sorunları, tümörler ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yer almıştır.

Son yıllarda giderek artan beslenme hassasiyeti ve doğal koruyucu gıda arayışları, bu meyveye olan ilgiyi artırmaktadır. Çeşitli ve faydalı birçok etkisi bulunan hünnap, antidiyabetik ve antioksidan etkileriyle ön plana çıkmaktadır. Başta polisakkaritler olmak üzere hünnap içeriğinde çok sayıda biyo-etkin bileşen bulunmaktadır. Bu derlemede; hünnap meyvesinin etkileri, bilimsel çalışmalar üzerinden anlatılmakta ve meyvenin genel özellikleri hakkında açıklayıcı bilgiler sunulmaktadır.

Hünnap ağacının genel özellikleri

Hünnap (Ziziphus jujuba), Rhamnaceae ailesine ait olup Ziziphus türlerinin en önemlisidir. Bölgeye göre 6 ila 9 m. arasında değişim gösteren güçlü ve sert gövdeye sahip bir ağaçtır. Ağaçları, yarı yaprak döken ve çok dallı yapıdadır. Kabuğu derin boylamasına oluklara sahiptir ve grimsi kahverengi ya da kırmızımsı renklidir. Hünnap, 4 tür filiz yapısına sahiptir; birincil filiz (uzayan), ikincil filizler (yan dallar), ana taşıyıcı filizler (meyveli mahmuz) ve meyve taşıyan sürgünler (dalcık). Dalcıklar, özellikle de genç zamanlarında, yoğun beyaz tüylü ve zigzag şekline eğilimlidir; daha sonra dik yayılarak gri kahverengi ve esnek bir hal alır. Meyve veren dalları, yaprak döken özellikte değildir. Yaprakları, parlak ve oval şekilde olup dal yapısına sahip değildir. Yapraklar 2,5 ila 5,5 cm. uzunluğunda ve 2 ila 4 cm. genişliğindedir. Çiçekleri kokulu, soluk yeşilimsi veya sarı renkte ve 4 ila 8 mm. arasında değişen çaplarda olup küçüktür. Bir hünnap çiçeği, 5 çanak yaprak (sepal), 5 taç yaprak (petal), 5 başçık (anter) içeren 2 yumurtalıklı yapıdadır. Çiçekler, tek başlarına veya her yaprak aksilinde küme halinde bulunabilir. Çiçeklenme, ağacın çeşidine ve bulunduğu kısma göre değişim gösterir. Hünnap, sert çekirdekli bir meyvedir ve ortasındaki tek çekirdekli kısımda, 2 adete kadar tohum içerir. Meyvesi, yumurtalık ve nektar diskten meydana gelir. Meyve büyüklüğü, çeşidine bağlı olarak başparmak büyüklüğünden golf topuna kadar değişir. Meyve şekli de yuvarlak, oval, elma benzeri veya anormal şekilli olabilir. Meyve dokusu; asidik ve tatlı, rengi yeşilimsi, sarı veya bazen de kırmızımsıdır (Mahajan ve Chopda, 2009; Yao, 2013).

Hünnap, çok çeşitli toprak tiplerine ve hava koşullarına iyi uyum sağlar. 0 ila 2.000 m. arasındaki rakımda ve pH'sı 5,5 ila 8,5 arası toprakta büyürler. Yazın 48,9 °C sıcaklığı bile tolere edebilir ve kışın da -30°C soğuğa dayanabilirler. Sezona geç başlaması nedeniyle de geç don riskinin büyük kısmından kaçınır ve nadiren mahsul kaybına uğrarlar. Ağaçlar, yıllık sadece 200 mm. yağış ile hayatta kalabilir,

ancak daha iyi meyve ve meyve kalitesi için daha fazla yağış veya ek sulamaya ihtiyaç gösterir. Hünnap üretimi için kök filizleri kullanılabilir ya da ekşi hünnap anaçları üzerine aşılama yapılabilir. En yaygın kullanılan çoğaltma yöntemi ise aşılama (Yao, 2013).

Hünnap meyvesinin besin içeriği

Hünnap, öncelikle yüksek lif içeriği ve fruktoz sayesinde sindirimi yavaşlatarak kan şekeri düzeyini kontrol altında tutmaya katkı sağlarken, diğer yandan da bu zengin lif içeriği nedeniyle doyurucu olması, kalori alımını da kontrol altında tutmaya yardımcı olmaktadır. Hünnap, esansiyel yağ asitlerinin önemli bir kaynağıdır; dolayısıyla meyvesi de doymamış yağ asitleri bakımından zengindir. Kurutulmuş meyvesinden elde edilen 33 yağ asidi bulunmaktadır. Yoğun bulunan yağ asitleri; oleik, linoleik, palmitik ve palmitoleik asitlerdir. Yüksek C vitamini içeriğine sahip olması, bir diğer dikkat çekici özelliğidir. Daha az olmakla birlikte hünnap meyvesi tiamin, riboflavin, niasin, B6 ve A vitaminleri gibi vitaminleri de içermektedir. Hünnap meyvesi; magnezyum, fosfor, potasyum, sodyum ve çinko açısından da iyi bir kaynaktır. Glikoz, fruktoz, sükröz, ramnoz ve sorbitol, içeriğinde bulunan başlıca şekerlerdir. Sitrik, süksinik ve malik asitler gibi organik asitler de bileşiminde tespit edilmiştir. Hünnap meyvesi, ayrıca farklı tiplerde amino asitler de içermektedir (Gao ve ark., 2013). Hünnap meyvesinin sahip olduğu besin içeriğine ait değerler sunulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Çiğ hünnap meyvesinin besin değerleri (100 g için). (U.S. Department of Agriculture Food Data Central, 2019).

İçerik	Değerler
Su	77.86 g
Enerji	79 kcal
Protein	1.2 g
Toplam yağ	0.2 g
Karbonhidrat	20.2 g
Kalsiyum, Ca	21 mg
Demir, Fe	0.48 mg
Magnezyum, Mg	10 mg
Fosfor, P	23 mg
Potasyum, K	250 mg
Sodyum, Na	3mg
Çinko, Zn	0.05 mg
Bakır, Cu	0.073 mg
Mangan, Mn	0.084 mg
Vitamin C	69 mg
Tiamin	0.02 mg
Riboflavin	0.04 mg
Niasin	0.9 mg
Vitamin B6	0.081 mg
Vitamin B12	0 µg
Vitamin A	2 µg
Retinol	0 µg
Trans yağ asitleri	0 mg
Kolesterol	0 mg

Çin'de bulunan 5 çeşit hünnap meyvesinin mineral, vitamin ve toplam fenolik içeriklerinin yaklaşık değerleri belirlenmiştir. Araştırmalar, Çin hünnapının %80.86 – 85.63 karbonhidrat, %57.61 – 77.93 indirgen şeker, %0.57 – 2.79 çözünür lif, %5.24 – 7.18 çözünmeyen lif, % 4.75 – 6.86 protein, %0.37 – 1.02 lipid, % 17.38 – 22.52 nem ve %2.26 – 3.01 kül içerdiğini göstermiştir. Çözünebilir şeker içeriği; fruktoz, glukoz, ramnoz, sorbitol ve sükrözu kapsamaktadır. Fruktoz ve glukoz, ana şekerler olarak tanımlanırken sorbitol, daha az miktarda mevcuttur. Potasyum, fosfor, kalsiyum ve manganez başlıca mineral bileşenleridir. Demir, sodyum, çinko ve bakır da kayda değer miktarlarda tespit edilmiştir. C vitamini, tiamin ve riboflavin içeriği sırasıyla 192–359, 0.04-0.08 ve 0.05-0.09 mg/100 g olarak bulunmuştur. Toplam fenolik içerikler; 5.18 ila 8.53 mg/g arasında değişmektedir. Çin'de yetişenlerden seçilen bu farklı hünnap çeşitleri için toplam fenolik içerik ile antioksidan kapasiteleri veya antioksidan kapasiteleri ile C vitamini içerikleri arasında ilişki bulunmamıştır (Li ve ark., 2007).

Hünnap meyvesindeki biyo-etkin bileşenler

Hünnap meyveleri, yüksek miktarda fenolik bileşenler içermektedir. Genetik farklılığın yanı sıra, rakım ve yıllık yağışlar da bu meyvelerdeki toplam fenolik madde miktarını etkilemektedir. Şiddetli kuraklık ve yüksek irtifa alanlarında yetişen meyveler, diğer bölgelerde yetişen meyvelere kıyasla daha fazla miktarda fenolik maddelere sahiptir; bu da daha yüksek antioksidan etki anlamına gelir (Sun ve ark., 2011).

Diğer yandan hünnap meyveleri, çeşitli flavonoidler de içermektedir. Flavonoidler, meyvelerin çeşidine ve olgunluk düzeyine göre önemli ölçüde değişebilir ve bitki prosiyanidin B2, epikateşin, kateşin, rutin, kuersetin-3-O-rutinosid, kuersetin-3-robinobiosid, kuersetin-3-O-galaktosid, kamferol-glukosil-ramnosid ve kamferol-glukosil-3-ramnosid gibi flavonoidleri içerir. Hünnap tohumları ise saponarin, spinosin, viteksin, svertiş, hidroksi benzoil spinosin ve feruloil spinosin içermektedir (Gao ve ark., 2013). Hünnap meyve, çekirdek ve kabuğundaki 8 fenolik asidin serbest, esterleşmiş, glikozidlenmiş ve çözünmeyen bağlı formları, araştırmacılar tarafından ayrıştırılmış ve ölçülmüştür. Meyvenin tümü gözönüne alındığında; p-hidroksi benzoik asit ve sinamik asitler en bol bulunan fenolik asitlerdir. Tüm ölçülmüş fenolik asitler, esas olarak hünnap kabuğunda da mevcuttur. Meyve dokusundaki fenolik asitler, daha çok glikozidlenmiş halde bulunurken, çekirdek ve kabuktakiler ise çözünmeyen bağlı formdadır. Hünnap meyvesindeki glikozidlenmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik asit fraksiyonları, en yüksek toplam fenolik içeriği temsil ederken, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal söndürücü kapasite) ve FRAP (demir-III iyonu indirgeyici antioksidan gücü) analizleri ile de belirlenen en güçlü antioksidan etkinliği sağlar (Wang ve ark., 2011).

Guo ve arkadaşları (2010); tarafından, hünnap meyvelerinin kloroform ekstraktlarında, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Diode Array Detektör (HPLC-DAD) ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS) kullanarak 11 farklı triterpenoid asit belirlenmiştir (seanotik asit, pomonik asit, alfitolik asit, maslinik asit, episeanotik asit, betulinik asit, oleanolik asit, ursolik asit, betulonik asit, oleanonik asit, ursonik asit). Bir diğer çalışmada ise kurutulmuş hünnap meyvelerinden 10 tane triterpenoid asit elde edilmiştir (seanotik asit, alfitolik asit, zizyberanal asit, zizyberanalik asit, episeanotik asit, seanotenik asit, betulinik asit, oleanolik asit, ursonik asit, zizyberanalik asit). Triterpenik asit profilleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde ise triterpenik asit içeriğindeki farklılıkların sadece hünnap türlerine göre değil, aynı zamanda bu meyvelerin yetiştiği toprak, coğrafi ve çevresel koşullar gibi durumlara bağlı olarak da oluştuğu anlaşılmaktadır (Guo ve ark., 2009).

Chang ve arkadaşları (2010), hünnap meyvelerinden polisakkaritlerin izolasyonu için uygun bir analitik metot geliştirmeyi ve bunların antioksidan etkinliklerini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında; bir nötr polisakkarit fraksiyonu (ZJPN) ve 3 asidik polisakkarit fraksiyonu (ZJPa1, ZJPa2 ve ZJPa3) izole etmişlerdir. Elde edilen polisakkaritlerin 6 adet monosakkarit (ramnoz, arabinoz, ksiloz, mannoz, glukoz ve galaktoz) ve galakturonik asit içerdiği tespit edilmiştir. Tüm bu 4 polisakkarit fraksiyonunun hidroksil radikallerine göre, süperoksit anyonları temizleme işleminde daha etkili olduğu bulunmuş; ayrıca asidik polisakkaritlerin demir iyonlarını şelatlama etkisinin daha belirgin olduğunu gösterilmiştir.

Hünnap meyvesinde en önemli etkinliğe sahip bileşenler, polisakkaritlerdir. Polisakkaritlerin çeşitli biyolojik etkinlikleri, kimyasal bileşimleri ve konfigürasyonları ile güçlü bir ilişki içindedir. Bu ilişkiyi açıklayabilecek çeşitli veriler bulunmaktadır. Örneğin; yüksek molekül ağırlığına sahip olan polisakkaritler, benzer kompozisyona sahip polisakkaritlerden daha yüksek antioksidan etkinlik sergilemektedir. Hünnap polisakkaritlerindeki üronik asit, hünnap ekstraktının fizikokimyasal özelliklerini ve çözünürlüklerini değiştirebilir, dolayısıyla biyolojik etkinlikleri açısından önemlidir. Üronik asit yönünden zengin fraksiyonların antioksidan etkinliklerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir (Ji ve ark., 2017).

Şan ve Yıldırım (2010), 4 çeşit hünnap meyvesi örneğinden α -tokoferol ve β -karoten ekstrakte etmişlerdir. Hünnap çeşitleri arasında fenolik ve yağ asidi içerikleri yönünden önemli farklılıklar bulunmuştur. Kateşin, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, apigenin-7-glukozid, eriodiktol, kuersetin, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit ve şiringik asit yapraklardan izole edilmiştir. Meyvelerden 7 fenolik bileşik (kateşin, kafeik asit, epikateşin, ferulik asit, rutin, p-hidroksi benzoik asit

ve klorojenik asit) izole edilmiştir. Baskın fenolik bileşenler, yapraklar için apigenin-7-glikozid ve meyveler için de kateşin ve rutin olarak bulunmuştur. α -tokoferol sadece seçilen 2 çeşitte tespit edilirken, β -karoten ise bir çeşitte diğerlerine göre yüksek miktarda bulunmuştur (Şan ve Yıldırım, 2010).

Hünnap meyvesinin biyolojik etkileri

Antidiyabetik etki

Hünnaptan elde edilen polisakkaritlerin yüksek fruktoz ile beslenmeden kaynaklanan insülin direnci ve dislipidemi üzerindeki etkisi, fareler üzerinde incelenmiştir. Elde edilen polisakkarit ekstraktın 400 mg/kg canlı ağırlık dozunda uygulanması; serum glukoz, insülin, total kolesterol (TC), trigliserid (TG), düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (LDL-c) ve çok düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (VLDL-c) seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-c) seviyesini, insülin direnci (HOMA-IR) ve β hücre fonksiyonunun (HOMA-B) homeostatik modeli değerlendirmesi sonuçlarını da belirgin şekilde iyileştirmiş ve yüksek fruktozlu suya maruz bırakılan farelerin aterosklerotik indeksini (AI) azaltmıştır. Boyama ile yapılan histopatolojik testler, yüksek fruktoz diyet ile indüklenen karaciğer steatozunu ve polisakkaritlerin bunun üzerindeki karaciğer koruyucu etkisini doğrulamaktadır. Bu bulgular, hünnap polisakkaritlerinin fruktoz uygulanan farelerde oluşan insülin direncini ve dislipidemi iyileştirebileceğini göstermektedir. Çalışmada etkisi incelenen ürün, ana bileşen olarak L-arabinoz, D-galaktoz ve D-galakturnik asit içeren asidik bir heteropolisakkarit olarak tanımlanmaktadır (Zao ve ark., 2014).

Hünnaptan elde edilen triterpenoidlerin ise iskelet kası hücrelerinde glukoz alım etkinliğini artırdığı, sıçan L6 miyotüp hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. Hünnap ekstraktının kas glukoz alımını indüklediği belirlendikten sonra etkin bileşikler betulonik asit, betulinik asit ve oleanonik asit tanımlanmıştır. Hünnapta olduğu bilinen ursonik asit, ursolik asitten yarı sentezlenir ve ayrıca glukoz alımını artırdığı gözlenmiştir. Bu 4 triterpenik asit, glikoz taşıyıcıya bağımlı bir şekilde glikoz alımını indüklemiştir. Çin, Güney Kore ve Japonya olmak üzere 3 ülkeden hünnap meyvelerinin karşılaştırmalı deneyleri, Japon hünnabının daha yüksek etkin triterpenoid içeriğine sahip olduğunu ve glikoz alımının en güçlü geliştiricisi olduğunu ortaya koymaktadır (Kawabata ve ark., 2017).

Antioksidan etki

Yapılan çalışmalar, hünnap meyvesinin fonksiyonel gıda özelliğini ortaya koymakta ve doğal antioksidan içeren ilaçların geliştirilmesinde kullanıma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin; Muzao kültür varyetesiinden elde edilen ham polisakkaritler saflaştırıldıktan sonra farklı moleküler ağırlıklarda GZMP-1, GZMP-2, GZMP-3 ve GZMP-4 olarak adlandırılan 4 farklı fraksiyon elde edilmiş ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Polisakkarit

fraksiyonlarında monosakkaritlerin analizi sonucu; ramnoz, arabinoz, glukoz, galaktoz ve galakturonik asidin ana bileşenler olarak bulunduğu tespit edilmiştir. DPPH ve hidroksil radikal temizleme aktivitesi ölçülerek antioksidan özellikleri saptanmıştır (Ji ve ark., 2018).

Polisakkaritlerin antioksidan etkileri, kimyasal özellikleri ve yapısal özellikleri ile yakından ilgilidir. Sülfat, amino, hidroksil ve karboksil gibi spesifik fonksiyonel grupların ve ayrıca molekül ağırlıklarının polisakkaritlerin antioksidan etkileri ile ilgili ilişki içinde olabileceği bilinmektedir. Azot merkezli stabil bir serbest radikal olan DPPH, canlı radikallerin yakalayıcı maddelerinden biridir. DPPH radikal temizleme etkinliği, bitkisel özlerin antioksidan etkinliğini belirlemek için kullanılan hızlı bir yöntemdir. Polisakkarit fraksiyonlarının DPPH radikal temizleme etkinliği, yapılan çalışmada gösterilmiştir ve numunelerin konsantrasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Hidroksil radikallerinin ortadan kaldırılması ise sağlığını koruması ve hastalıkların önlenmesi için anahtardır. Sonuçlar, saflaştırılmış fraksiyonların antioksidan kapasitesinin, ham polisakkarite kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Bu durum; fenolik bileşikler, tokoferol veya pigmentler gibi diğer fitokimyasalların bulunmaması ile ilişkili olabilir. Daha yüksek galakturonik asit içeriği ve hünnap polisakkaritlerinin daha küçük moleküler ağırlığa sahip olmasının, hidroksil radikalının süpürülmesi üzerinde daha güçlü etkilere neden olabileceği düşünülmektedir. Hidroksil radikal temizleme etkinliği, ayrıca polisakkaritlerdeki anomerik hidrojen ile de ilgilidir (Ji ve ark., 2018).

Antitümöral etkinlik

Hünnaptan saflaştırılmış farklı yapıdaki polisakkaritlerin biyolojik etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde in vitro antitümör çalışmaları yapılmıştır. Huo-ji polisakkaritlerinden (HJP), yüksek performanslı iyon değişimi kromatografisi ile sırasıyla HJP1, HJP2, HJP3 olarak adlandırılan 3 ana fraksiyon izole edilmiştir. Bu çalışmada HJP1 ve HJP3, yapıları, fonksiyonel özellikleri ve aralarındaki farklılığı açıklamak için yapıları daha fazla araştırılan ana bileşenlerdir (sırasıyla %18.62, %40.17). Fraksiyonların biyolojik etkinliğini araştırmak için HepG2 hücreleri üzerindeki inhibitör etkileri, hücre canlılık testlerinden MTT analizi uygulanarak test edilmiş, böylece HJP1 ve HJP3'ün in vitro antitümör etkinlikleri gösterilmiştir. HJP3, HepG2 hücreleri üzerinde HJP1'den daha güçlü antiproliferasyon etkinliği göstermiştir. HJP3 ve HJP1 arasındaki bu etkinlik farkı, moleküler ağırlıklarındaki ve monosakkarit kompozisyonlarındaki farklılıklardan dolayı olabilir. HJP3, daha düşük moleküler ağırlıktadır, daha uzun konformasyon dizilimine sahiptir ve sulu çözeltide daha yüksek hidrodinamik hacmi sağlayabilen yüksek negatif yüklere sahiptir. HJP3'ün ve HJP1'in yapılarındaki farklı galaktoz ve

arabinoz oranları da biyolojik etkinliklerini etkileyebilir. Anlamlı bir etkinliğe sahip olup olmadığını tam olarak belirlemek için de normal karaciğer hücrelerindeki uygulama sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, HJP3'ün sadece tümör hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde önleyebildiğini ve tümör olmayan hücre hatlarında önemli ölçüde daha düşük bir sitotoksosite sergilediğini ve diğer kemoterapötik ilaçlardan daha güvenli olduğunu göstermektedir (Wang ve ark., 2015).

Polisakkaritlerin antitümör etkinliği; moleküllerin boyutları, formları, dallanma derecesi ve suda çözünürlüğünden etkilenir. Genel olarak, moleküler ağırlık ve suda çözünürlük arttıkça, polisakkaritlerin antitümör etkinliği de artar. Birçok çalışmada, polisakkaritlerin farklı mekanizmalar ile güçlü antitümör etkinlik sergilediği gösterilmiştir. Polisakkaritlerin antitümör etkileri, 4 farklı mekanizmaya ayrılabilir: Bunlar; onkogenezin polisakkaritlerin oral uygulaması sonucu önlenmesi, tümörlere karşı bağışıklık yanıtında iyileşme, tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyerek doğrudan antitümör etkinliğin sağlanması ve tümör hücrelerinin vücutta yayılmasının önlenmesidir (Ji ve ark., 2017).

Gastrointestinal koruyucu etki

Yabani hünnaptan çıkarılan polisakkaritlerin, sıçanlarda trinitrobenzen sülfonik asitin (TNBS), rektal uygulaması ile indüklenen kolit üzerine olan etkisi incelenmiştir. Uygulanan tedavi; vücut ağırlığı, hastalık aktivite indeksi (DAI) skorları, kolon uzunluğu, ıslak organ ağırlığı (cm başına kolon ağırlığı) ve kolonun histopatolojik hasarları ile değerlendirildiğinde; kolitlerden belirgin koruma ile sonuçlanmıştır. TNBS indüksiyonundan sonra kolonun makroskopik muayenesinde; hiperemi, bağırsakta kalınlaşma ve geniş ülserasyon alanı görülmüştür. Polisakkaritler, bu değişiklikleri hafifletmiş ve kolon hasarının ciddiyetini kontrol grubuna kıyasla azaltmış, kolit belirtilerini belirgin şekilde iyileştirmiş ve kolon dokularını daha sağlam bir yapıya kavuşmuştur. Histolojik skorlar açısından tedavi edilen grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kolon inflamasyonu ve kolon hücre bütünlüğünün korunmasında önemli bir iyileşme olduğu anlaşılmaktadır. Bulgular, tedavi edilen sıçanlarda yeniden epitelizeasyonun ve iyileşmenin başladığını göstermektedir. Ayrıca bağırsak bariyeri etkinleştirilmiş ve aktive edici protein kinazın (AMPK) etkinleşmesi sağlanmıştır (Yue ve ark., 2015).

Karaciğer koruyucu etki

Hünnaptan elde edilmiş polisakkaritlerin ksenobiyotik kaynaklı oksidatif hepatotoksosite üzerine etkileri incelenmiştir. Örnek verdiğimiz çalışmada kullanılan yabani hünnap polisakkaritleri (PWJS), asidik bir heteropolisakkarittir ve glikoz (%38.59), arabinoz (%23.16), galakturonik asit (%17.64) ve galaktoz (%10.44) bakımından

zengindir. Çalışmada; oksidatif hepatotoksosite karbondiklorür (CCl₄) tarafından uyarılmıştır. CCl₄, sitokrom P4502E1 (CYP2E1) tarafından triklorometil radikal ve proksi triklorometil radikaline metabolize edilir ve bu olay, membran lipid peroksidasyon işlemi başlatabilir; sonuç olarak da hücre nekrozu başlar. Test gruplarındaki fareler, sırasıyla 200, 400 ve 800 mg/kg günlük canlı ağırlık dozunda PWJS oral dozlarını almıştır. Pozitif kontrol olan azaltılmış glutatyon grubunda, farelere referans ilaç olarak azaltılmış glutatyon verilmiştir. PWJS tedavisi, CCl₄'e maruz farelerde, serum ALT ve AST seviyelerini düşürmüştür. PWJS müdahalesi ile karaciğer hasarlı farelerdeki antioksidan enzimler (süper oksit dismutaz, SOD ve katalaz, CAT) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri yükselirken, malondialdehid (MDA) düzeyleri azalmış ve lipid peroksidasyon da önemli derecede önlenmiştir (Yue ve ark., 2014).

İmmunomodulatör etki

Yapılan çalışmalar, hünnaptan elde edilen polisakkaritlerin fonksiyonel yiyeceklerde veya ilaçlarda kullanım için yeni bir doğal immunostimulan potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada; suda çözünebilir polisakkaritlerin 2 farklı fraksiyonu elde edilerek RQP1d ve RQP2d olarak adlandırılmıştır. RQP1d, protein içermez ve büyük miktarda üronik asit içerir. Buna karşılık RQP2d, %17,05 protein ile birlikte, karbonhidrat içeriği yönünden de baskındır. Son olarak, ön immunolojik testler, hem RQP1d, hem de RQP2d'nin RAW264.7 makrofajlarında nitrik oksit (NO) üretimini önemli ölçüde uyardığını ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen splenosit proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. NO, nitrik asit sentaz (NOS) ile L-arginin'den sentezlenen bir gaz molekülüdür ve patolojik süreçlerde sitotoksik bir ajan, apoptozun bir indükleyici veya bastırıcısı ve bir immunoregülatör olarak görev yapar. NO, makrofajlar tarafından üretilen majör efektör bir molekül olarak tanımlanmıştır ve makrofaj etkinleşmesinin nicel indeksi olduğuna inanılmaktadır. Hem RQP1d, hem de RQP2d, RAW264.7 hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde, NO üretimini indüklemiştir. NO üretiminin, muamele edilmemiş gruba kıyasla 48. saatte yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiştir. Sırasıyla T- ve B-lenfositleri ile karakterize edilen hem hücre, hem de humoral bağışıklığı içeren bağışıklık tepkisi, antitümör ve enfeksiyöz etkenlere karşı konakçının savunması gibi önemli görevlere sahiptir. Splenosit proliferasyonu, immun güçlenmenin bir göstergesidir ve T-lenfositlerin veya B-lenfositlerin immunité gelişimi ile ilgilidir. Konkanavalin A (ConA) veya LPS mitojenleri varlığında, splenosit proliferasyonunda da RQP1d ve RQP2d'nin etkisi araştırılmış ve hem RQP1d, hem de RQP2d'nin, test edilen konsantrasyonda ConA ile uyarılmış splenosit proliferasyonunu desteklemediği gösterilmiştir. Buna karşılık, 3 farklı konsantrasyonda (10, 100, 200

g/mL) RQP1d, LPS kaynaklı hücre çoğalmasını geliştirmiştir. RQP2d ise sadece düşük konsantrasyonda (10 g/mL), LPS ile sinerjistik bir etkiye sahiptir (Cui ve ark., 2014).

Saç büyümesi üzerine olan etkisi

Ziziphus jujuba tohumlarından elde edilen esansiyel yağların in vivo olarak saç büyümesindeki potansiyel rolü incelenmiştir. Elde edilen esansiyel yağ, BALB/c farelerinin sırt kısmındaki traşlı cilt üzerine farklı konsantrasyonlarda (% 0.1, % 1 ve %10) uygulanmış ve 21 gün boyunca izlenmiştir. Çalışmanın sonucunda; %1 ve %10 yağ uygulanmış farelerin kıl uzunluğu üzerinde önemli ölçüde etkili olduğu görülmüş ve kıl uzunlukları sırasıyla 9.96 ve 10.02 mm olarak ölçülmüştür. Kontrol grubunda ise uzunluk 8.94 mm olarak belirlenmiştir. Dorsal derinin kıl/cm² alanının ağırlığı ve mikroskopik olarak saç kalınlığı ve saç köklerinin değerlendirilmesi, tüyler traş bölgesinden alındıktan sonra yapılmış ve %1 esansiyel yağ ile muamele edilmiş fareler için en iyi sonuç elde edilmiştir. Bu çalışma ile hünnaptan elde edilen esansiyel yağın, saçta büyümeyi teşvik edici etkinliğe sahip olduğu sonucuna varılmaktadır (Yoon ve ark., 2010).

Beyin koruyucu etki

Hünnabın beyin üzerindeki yararlı rolünü incelemek için sıçan adrenal medullasının türetilen feokromositoma PC12 hücrelerinin nöronal farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. PC12 hücrelerinin karakterleri, sempatik nöron sistemine çok benzemektedir ve sinir büyüme faktörüne karşılık gelen nörofilament ekspresyonu ve nöron büyümesi benzeri gelişimlerin gözlemlenmesine olanak sağlamaktadır. Ekstrakt, PC12 hücrelerinde nöron benzeri farklılaşmayı indüklemiştir ve PC12 hücrelerinde %25'ten fazlasında farklılaşma ayırt edilmiştir. Buna paralel olarak, hünnap ile tedavi edilen kültürlerde nörofilamentlerin (NF'ler) ekspresyonları, doza bağlı bir artış göstermiştir. Çalışmada; pozitif kontrol grubunda, sinir büyüme faktörü (NGF) kullanılmıştır. Farklılaşma etkisini ölçmek için farklılaşmış hücre sayılarının ve uzunluklarının yüzdesi, mikroskop altında sayılarak elde edilmiştir. Morfolojik keşfe ek olarak farklılaşma, nöronal hücreye özgü hücre iskeleti proteinleri (NF68, NF160 ve NF200) olan nörofilamentlerin ekspresyonunun belirlenmesinde biyokimyasal bir analiz ile değerlendirilmiştir. Hünnap ekstraktının 72 saat süre ile çeşitli konsantrasyonlarda (0.75, 1.5 ve 3.0 mg/mL) işlenmesi; NF68, NF160 ve NF200 ekspresyonlarını en yüksek oranlarda sırasıyla % 150, % 150 ve % 100 oranlarında indüklemiştir (Chen ve ark., 2014).

Araştırmacılar, hünnap ekstresindeki cAMP'nin, nöronal farklılaşma üzerindeki etkisinden sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir. Burada, PC12 hücrelerine cAMP uygulanmış ve PC12 hücrelerinde hem büyüme, hem de nörofilament ekspresyonunu indükleyebildiği tespit edilmiştir. cAMP ile karşılaştırıldığında; hünnap ekstraktının etkisi,

özellikle 15 ila 30 µm. arasındaki nörit uzunluğunda daha yüksektir. Ayrıca kateşin, prosiyanidin B2, epikateşin, kuersetin, galaktosid, kuersetin 3-O-rutinosid, kuersetin 3-O-B-g-glukosid ve kamferol 3-O-rutinosid de araştırılmış, ancak önemli bir etki gözlenmemiştir. Hünnap özü, NF200'ün ekspresyonu üzerinde cAMP'den daha iyi etki gösterirken cAMP, NF160 ekspresyonunda hünnap ekstraktından daha iyi bir etkinliğe sahiptir. NF68'de ekstrakt ile cAMP arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Chen ve ark., 2014).

Gerçekleştirilen çok sayıda araştırmada; hünnap bitkisinin nörotoksin stresine karşı nöron hücrelerinin korunması, nöronal farklılaşmanın uyarılması, nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu artırma, hafızayı ve öğrenmeyi teşvik edici etkiler gibi nöroprotektif etkinliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Belirtilen biyolojik etkinlikler için flavonoidler, cAMP ve hünnap ekstraktının potansiyel biyo-etkin maddeler olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, hünnapın nörolojik hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde kullanılacak sağlık takviyelerinin geliştirilmesi için potansiyel aday olabileceğini göstermektedir (Chen ve ark., 2017).

SONUÇ

Hünnap meyvesinin çok sayıda ve önemli biyolojik etkilere sahip olduğu açıktır. İçeriğindeki biyo-etkin bileşiklerin etki mekanizmaları, moleküler düzeyde henüz tam olarak bilinmemektedir; ayrıca hangi bileşiğin, hangi etkiyi oluşturduğu da çoğunlukla net değildir. İçeriğindeki en önemli madde olan polisakkaritler yönünden, ekstraksiyon yöntemine göre elde edilen fraksiyonlar, her çalışmada farklılık göstermektedir. Ayrıca benzer kompozisyona sahip polisakkaritler arasında da molekül ağırlığı, molekül şekli ve içerdiği asidik bileşenler yönlerinden bulunan farklılıklar, bu fraksiyonların da etkinliğini değiştirmektedir. Mevcut çalışmaların çoğunda in vitro yöntemler izlenmiş olup farklı doz ve yollarda yapılmış sistematik hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır. Öte yandan hünnap meyvesinin antidiyabetik etki mekanizması, net olarak açıklığa kavuşturulmamış olup bu konuda da araştırmalara gerek duyulmaktadır. Hünnap, sahip olduğu biyo-etkin bileşenleri ile hala keşfedilmeye değer bir meyve olarak durmakta ve günlük beslenmemizde daha fazla yer almayı fazlasıyla hak etmektedir

Çıkar Çatışması

Yazar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: SK, ŞEH, AAH; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** SK, ŞEH, AAH.

KAYNAKLAR

- Chang, S. C., Hsu, B. Y., & Chen, B. H. (2010). Structural characterization of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 445-453.
- Chen, J., Liu, X., Li, Z., Qi, A., Yao, P., Zhou, Z., & Tsim, K. W. (2017). A review of dietary *Ziziphus jujuba* fruit (Jujube): Developing health food supplements for brain protection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8, 9.
- Chen, J., Maiwulanjiang, M., Lam, K. Y., Zhang, W. L., Zhan, J. Y., Lam, C. T., & Tsim, K. W. (2014). A standardized extract of the fruit of *Ziziphus jujuba* (Jujube) induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: a signaling mediated by protein kinase A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1890-1897.
- Cui, G., Zhang, W., Wang, Q., Zhang, A., Mu, H., Bai, H., & Duan, J. (2014). Extraction optimization, characterization and immunity activity of polysaccharides from *Fructus Jujubae*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 245-255.
- Guo, S., Duan, J. A., Tang, Y., Su, S., Shang, E., Ni, S., & Qian, D. (2009). High-performance liquid chromatography—Two wavelength detection of triterpenoid acids from the fruits of *Ziziphus jujuba* containing various cultivars in different regions and classification using chemometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1296-1302.
- Guo, S., Duan, J. A., Tang, Y. P., Yang, N. Y., Qian, D. W., Su, S. L., & Shang, E. X. (2010). Characterization of triterpenic acids in fruits of *Ziziphus* species by HPLC-ELSD-MS. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 58(10), 6285-6289.
- Ji, X., Peng, Q., Yuan, Y., Shen, J., Xie, X., & Wang, M. (2017). Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (*Ziziphus jujuba* Mill.): A review. *Food Chemistry*, 227, 349-357.
- Ji, X., Liu, F., Ullah, N., & Wang, M. (2018). Isolation, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1-11.
- Kawabata, K., Kitamura, K., Irie, K., Naruse, S., Matsuura, T., Uemae, T., & Kawakami, B. (2017). Triterpenoids isolated from *Ziziphus jujuba* enhance glucose uptake activity in skeletal muscle cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 63(3), 193-199.
- Li, J. W., Fan, L. P., Ding, S. D., & Ding, X. L. (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry*, 103(2), 454-460.
- Mahajan, R. T. C. M., & Chopda, M. (2009). Phyto-Pharmacology of *Ziziphus jujuba* Mill-A plant review. *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), 320.
- San, B., & Yildirim, A. N. (2010). Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 706-710.
- Sun, Y. F., Liang, Z. S., Shan, C. J., Viernstein, H., & Unger, F. (2011). Comprehensive evaluation of natural antioxidants and antioxidant potentials in *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex HF Chou fruits based on geographical origin by TOPSIS method. *Food Chemistry*, 124(4), 1612-1619.
- Wang, B. N., Liu, H. F., Zheng, J. B., Fan, M. T., & Cao, W. (2011). Distribution of phenolic acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1288-1292.
- Wang, M., Gao, Q. H., Shen, J., Wang, X. Q., & Ji, X. L. (2016). The jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Chinese Dates*, 53-82.
- Wang, Y., Liu, X., Zhang, J., Liu, G., Liu, Y., Wang, K., & Zhao, Z. (2015). Structural characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. Muzao. *RSC Advances*, 5(11), 7860-7867.



DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1145053>



Tek Sağlık Uygulamalarının Değerlendirilmesi: Standardize Edilmiş Güncel Yöntemler

Pınar ŞAHİNTÜRK¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 18.07.2022 **Kabul Tarihi / Accepted:** 16.09.2022

ÖZ

Tek Sağlık yaklaşımı, hayvan-insan-ekosistem etkileşiminde halk sağlığı sorunlarının ele alınmasında kritik bir araç olarak önem kazanmaya devam etmektedir. Küresel düzeyde bu kavrama geniş bir destek vardır ve bu durum dünya çapında çeşitli Tek Sağlık girişimlerinin kurulmasına yol açmıştır. Tek Sağlık topluluğu için güncel bir zorluk, Tek Sağlık'ın sürdürülebilirliğini sağlamak için eylem çağrısının ve temel prensiplerin ilerisine nasıl geçileceğidir. Gerçek dünyaya ilişkin verilerin yetersizliği, insan-hayvan-çevre sağlığı eksenindeki eksikliklerin tespit edilmesini engellemekte, bu durum politika ve uygulamaların şekillendirilmesinde Tek Sağlık yaklaşımının uygulanmasını zorlaştırmakta; önleme ve kontrol faaliyetlerinin gecikmesine veya eksik kalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle Tek Sağlık'ın hastalıkların önlenmesi ve kontrolü, antimikrobiyal direnç, gıda güvenliği ve çevre sağlığı alanlarındaki ek faydalarını gösteren standardize edilmiş analizler önemlidir ve bunların değerlendirilmesi gerekmektedir. Tek Sağlık Değerlendirme Ağı (NEOH), Küresel Sağlık Güvenliği (GHS) Endeksi, Çevresel Performans Endeksi (EPI) ve Küresel Tek Sağlık Endeksi (GOHI) gibi uygun bir değerlendirme şeması ile birlikte iyi yapılandırılmış kavramsal sistemler, mevcut durumun daha iyi anlaşılmasına ve Tek Sağlık uygulaması için belirli sosyo-ekolojik ortamlara kolayca uyarlanmış hedef ve stratejilerin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir. Tek Sağlık uygulamalarının değerlendirilmesi için standardize edilmiş yöntemlerin geliştirilmesi, Tek Sağlık girişimlerinde daha uzun vadeli yeni kazanımları daha kalıcı hale getirmek için büyük bir fırsat sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tek Sağlık Uygulamaları, Zoonoz, Antimikrobiyal Direnç, İklim Değişikliği.

Evaluation of One Health Implementations: Current Standardized Frameworks

ABSTRACT

The One Health approach continues to gain recognition as a critical tool to address public health issues at the animal-human-ecosystem interface. At a global level, there is broad support for the concept, which has led to the establishment of several One Health initiatives around the world. A current challenge for the One Health community is how to go beyond the call for action and key principles to ensure the sustainability of One Health. The dearth of real-world evidence has hindered the identification of gaps in the human-animal-environment health nexus, which hampers the application of a One Health approach in shaping policies and practice, and results in delayed or incomplete prevention and control measures. Therefore, formal standardized analyses showing the added benefits of One Health in disease prevention and control, antimicrobial resistance, food safety, and environmental health is important and need to be assessed. A well-constructed conceptual systems, along with an appropriate evaluation scheme, such as Network for Evaluation of One Health (NEOH), Global Health Security (GHS) Index, The Environmental Performance Index (EPI), and Global One Health Index (GOHI) can help to better understand the current situation and to set goals and strategies for One Health implementation, readily tailored to specific social-ecological settings. The development of a potential evaluation tool for One Health performance framework provides a great opportunity to make new capacities more durable for longer-term gains in One Health initiatives.

Keywords: One Health Implementations, Zoonoses, Antimicrobial Resistance, Climate Change.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Pınar ŞAHİNTÜRK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Departmanı, İzmir, Türkiye.

E-mail: pinar.sahinturk@deu.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Sahinturk, P. (2022). Tek sağlık uygulamalarının değerlendirilmesi: standardize edilmiş güncel yöntemler. *BAUN Sağ Bil Derg*, 2022; 11(Supplement 1): 51-58. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1145053>.



BAUN Health Sci J 2022 OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Son yıllarda, Tek Sağlık yaklaşımı tıp ve veteriner bilimlerinden zoonotik hastalıklar, antimikrobiyal direnç, gıda güvenliği ve gıda güvencesi, vektör aracılığıyla bulaşan hastalıklar, çevresel kirlenme ve insanlar, hayvanlar ve çevre tarafından paylaşılan diğer sağlık tehlikeleri de dahil olmak üzere hızla büyüyen bir dizi eş güdümlü alanı kapsayacak şekilde genişlemiştir (Bronzwaer ve ark., 2021; CDC, NCEZID). Örneğin:

-Antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler; topluluklara, gıda tedarikine, sağlık kuruluşlarına ve çevreye (toprak, su) hızla yayılarak hayvanlarda ve insanlarda belirli enfeksiyonların tedavisini zorlaştırabilmektedir.

-Vektör aracılığıyla bulaşan hastalıklar; sıcakların artması, sivrisinek ve kene habitatlarının yaygınlaşması ile birlikte artış göstermektedir.

-Besi hayvanlarında görülen hastalıklar; besin kaynaklarını, geçim kaynaklarını ve ekonomileri tehdit edebilmektedir.

-İnsan-hayvan bağı; ruh sağlığının iyileştirilmesine yardımcı olabilmektedir.

-Tüketim, rekreasyon ve daha fazlası için kullanılan suyun kirlenmesi insanları ve hayvanları hasta edebilmektedir (CDC; NCEZID).

1 Aralık 2021'de Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı'nın (UNEP) Tek Sağlık Üst Düzey Uzman Paneli (OHHLEP) Tek Sağlık'ı resmi olarak "ulusal, bölgesel ve küresel düzeyde uygulanabilen, hem insanlar hem de hayvanlar için en iyi sağlık sonuçlarına ulaşma nihai hedefi ile ilgili tüm sektörler ve disiplinler arasında işbirliği, iletişim ve koordinasyona dayalı insan-hayvan-çevre etkileşimindeki bir sağlık tehdidini ele alma yaklaşımı" olarak tanımlamıştır (OHHLEP Annual Report, 2021).

Küresel düzeyde, Tek Sağlık kavramına yönelik geniş bir destek vardır ve bu durum dünya çapında çeşitli Tek Sağlık girişimlerinin kurulmasına yol açmıştır: ABD'de (1) ABD'de Ulusal Park Servisi Tek Sağlık Girişimi, (2) Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri Tek Sağlık Ofisi ve (3) ABD Tarım Bakanlığı Tek Sağlık Koordinasyon Merkezi, kurumlar arası çalışma grupları ve ulusal çok sektörlü koordinasyon mekanizmalarından (4) Bangladeş Tek Sağlık Sekreterliği ve (5) Liberya Tek Sağlık Koordinasyon Platformu, uluslararası Tek Sağlık ağları ve konsorsiyumlarından (6) FAO/OIE/ WHO Üçlü işbirliği, (7) Tek Sağlık İş Gücü, (8) Güney Asya Tek Sağlık Birliği, (9) Güneydoğu Asya Tek Sağlık Üniversite Ağı, (10) Orta ve Doğu Afrika Tek Sağlık için belirlenmiş lisans ve eğitim programları. Ayrıca, Tek Sağlık uygulamalarını teşvik etmek ve hastalık tehditlerini önleme, tespit etme ve bunlara müdahale etme konusundaki kapasiteleri güçlendirmek amacıyla ülkeleri bir araya getirmek için 2014 yılında başlatılan Küresel Sağlık Güvenliği Gündemi 'ne

(GHTA) yaklaşık 50 ülke imza atmıştır (Kelly ve ark., 2020).

Tek Sağlık yaklaşımının uygulanması bütüncül bir bakış açısını temsil etmektedir (Zhang ve ark., 2022). Geçtiğimiz on yıl boyunca, pek çok ülke tarafından Tek Sağlık yaklaşımı benimsenmiş ve bilinen faydaları ortaya konmuştur (Sinclair, 2019). Tek Sağlık yaklaşımı, çeşitli düzeylerde entegre ve birleştirici bir yaklaşım anlamına gelmektedir: öncelikle, insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre sağlığı arasındaki yakın ilişkileri kabul eder; ikinci olarak, toplumun farklı düzeylerinde birden fazla sektörü, alanı ve topluluğu harekete geçirir; üçüncü olarak, pandemiye hazırlık ve müdahale, iklim değişikliği vb. gibi küresel, bölgesel ve yerel düzeylerdeki tehditlerle mücadele etmek için ülkeler ve bölgeler arasında ortak işbirliğini teşvik eder ve dördüncü olarak, insan-hayvan-çevre sistemlerinin sürdürülebilir kalkınması için daha geniş toplumsal katılımı ve daha güçlü bir toplumsal farkındalığı sağlar (Zhang ve ark., 2022). Tek Sağlık, hastalık riskini ve etkilerini azaltmak amacıyla erken teşhis ve tehlikelerin daha iyi anlaşılması için karşılaştırmalı tıbbın kapsamını hayvanlarda ve çevrede yapılacak gözetimlere kadar genişletmektedir. Örneğin, Ebola virüsü ile ilişkili büyük maymun ölümleri genellikle insanlardaki salgınlardan önce tespit edilmiş ve avcıların leşlerden kaçınması gibi risk azaltma önlemleriyle eşleştirildiğinde insanlardaki vakaları önlemeye yardımcı olabilecek potansiyel bir tahmin değeri sağlamıştır. Buna ek olarak hava durumu değerlendirilerek, Rift Vadisi humması ve diğer salgınlardan etkileri öngörülebilmektedir. Sonuç olarak salgın hastalıkların sağlık ve ekonomik sonuçlarını azaltmak için aşılama ve sivrisinek kontrol çalışmaları yapılmıştır. Entegre şekilde yapılan insan, hayvan ve çevre gözetimi de aynı şekilde patojen yayılım yollarını aydınlatılmakta ve hastalığın kaynağında önlenmesini vurgulayan daha kapsamlı çözümlerin geliştirilmesi konusunda bilgi verebilmektedir (Kelly ve ark., 2020)

GENİŞLEME

Tek Sağlık yaklaşımı kabul görmüş olsa da belirleyicileri ve uygulamadaki kolaylaştırıcıları henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (Zhang ve ark., 2022). Tek Sağlık'ın birden fazla disiplin ve sektörün sinerjisini teşvik eden geniş ve genellikle her şeyi kapsayan doğası nedeniyle, Tek Sağlık uygulamalarının katkılarını resmi olarak değerlendirmek için Tek Sağlık etki göstergelerini net bir şekilde belirleme konusunda zorluklarla karşılaşmaktadır (Sinclair, 2019). Gerçek dünyadan elde edilen bulguların yetersizliği, insan-hayvan-çevre sağlığı eksenindeki boşlukların tespit edilmesini engellemiş, bu durum politika ve uygulamaların şekillendirilmesinde Tek Sağlık yaklaşımının uygulanmasını zorlaştırmış; önleme ve kontrol tedbirlerinin gecikmesine veya eksik kalmasına neden olmuştur. (Zhang ve ark., 2022;

Kelly ve ark., 2020). Tek Sağlık alanındaki güncel bir zorluk, Tek Sağlık'ın sürdürülebilirliğini sağlamak için eylem çağrısının ve temel prensiplerin ilerisine nasıl geçileceğidir. Bazı temel sorular şunlardır:

- Bütüncül yaklaşım birden fazla sektör ve disiplinin katılımını gerektirirken Tek Sağlık yaklaşımının etkisini ölçmek için uygun göstergeler nelerdir?
- Tek sektörlü ve çok sektörlü göstergeler nasıl toplanmalı ve karşılaştırılmalıdır?
- Altyapı geliştirme, finansman, laboratuvar ve gözetim kapasitesi, hazırlık, müdahale ve iletişim gibi çok çeşitli bileşenlerin etkisini ölçmek için nasıl bir yol izlenmelidir? (Sinclair, 2019).

Tek Sağlık uygulamalarının yararlarının gösterilmesi genellikle küçük ölçekli projelerle sınırlı kalmıştır. Konuyla ilgili yayınlanan derlemelerin çoğu yalnızca nicel göstergeleri dikkate almış, ancak girişimlerin nasıl ve neden etkili olup olmadığını ve etkili yönetim yaklaşımlarını anlamak için çok önemli olan nitel ve karma yöntem değerlendirmeleri hariç tutulmuştur (Delesalle ve ark., 2022).

Tek Sağlık yaklaşımının sürdürülebilirliğini sağlamak için, Tek Sağlık savunucularının ve uygulayıcılarının, politika kararlarının ve kaynak tahsislerinin gerekçelendirilmesine yardımcı olmak üzere Tek Sağlık'ın etkisine ilişkin ülke düzeyinde veri toplaması ve karar alıcılara sunması gerekmektedir (Sinclair, 2019). Tek Sağlık yaklaşımı hastalıkların önlenmesi ve kontrolü, antimikrobiyal direnç, gıda güvenliği ve çevre sağlığı alanlarındaki ek faydalarını gösteren standardize edilmiş resmi değerlendirme yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Delesalle ve ark., 2022; Kelly ve ark., 2020). Uygun bir değerlendirme şemasıyla birlikte iyi yapılandırılmış bir kavramsal sistem, mevcut durumun daha iyi anlaşılmasına ve Tek Sağlık uygulaması için belirli sosyo-ekolojik ortamlara kolayca uyarlanmış hedef ve stratejilerin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir (Zhang ve ark., 2022).

TEK SAĞLIK UYGULAMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tek Sağlık topluluğu, Tek Sağlık planlamasında ve kaynak haritalamasında sürdürülebilirliği desteklemek ve mevcut yapıları, değerlendirmeleri ve önceliklendirme araçlarını uygulamak için etki ölçümlerinin temel gerekliliklerden biri olduğunu kabul etmektedir (Sinclair, 2019). Tek Sağlık uygulamasını değerlendirmek ve katma değerini ölçmek için yapılar ve yöntemler kullanmak, uzun vadede etkili uygulama stratejileri hakkında daha sağlam sonuçlara ulaşılmasını sağlayacak ve bu yöntemler daha sonra karar alıcılar için model teşkil edebilecektir (Delesalle ve ark., 2022).

Tek Sağlık Değerlendirme Ağı (NEOH), Küresel Sağlık Güvenliği (GHS) Endeksi, Çevresel Performans Endeksi (EPI) ve Küresel Tek Sağlık Endeksi (GOHI) gibi bugüne kadar geliştirilen metodolojik yapılar, Tek Sağlık uygulamalarının

uygun şekilde değerlendirilmesine yardımcı olabilmektedir.

Tek sağlık değerlendirme ağı (NEOH)

NEOH (<http://neoh.onehealthglobal.net>), Avrupa Bilim ve Teknoloji İş birliği (COST) tarafından finanse edilen ve dünya çapında 30'dan fazla ülkeden 250'den fazla bilim insanını ve Tek Sağlık uygulayıcısını bir araya getiren bir girişimdir. NEOH değerlendirme yapısı şu unsurlardan oluşmaktadır: (1) Tek Sağlık girişiminin ve bağlamının tanımı; (2) beklenen ve beklenmeyen sonuçların değerlendirilmesiyle birlikte değişim teorisinin tanımı; (3) operasyonel ve destekleyici altyapıların süreç değerlendirmesi ve (4) süreç değerlendirmesi ile elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi (Rüegg ve ark., 2018).

NEOH değerlendirme yapısı sistematik bir yaklaşım kullanmakta ve Tek Sağlık girişiminin bağlamı içinde faaliyet gösterdiği sistem, girişimin kendisini de sistemi az ya da çok etkileme potansiyeline sahip bir alt sistem olarak görmektedir. Tek Sağlık girişimlerinin temel özellikleri etkenler, operasyonlar, destekleyici altyapı ve sonuçlar olarak tanımlanmıştır. NEOH değerlendirme yapısı Tek Sağlık uygulamalarını; Tek Sağlık düşüncesi, Tek Sağlık planlaması ve Tek Sağlık çalışması başlıkları altında kategorize ederek ve destekleyici alt yapıları (sistemik organizasyon, öğrenme ve paylaşım) ortaya koymakta ve Tek Sağlık girişiminin ortaya çıkardığı değişiklikleri sonuçlarla ilişkilendirmektedir (Rüegg ve ark., 2018).

Tek sağlık uygulamalarının değerlendirilmesi:

Halk sağlığı

Halk sağlığı ve sağlık sistemi kapasiteleri, tüm insanların halk sağlığı tavsiyelerine uymasını sağlayan politika ve programlarla birleştirilmelidir (Bell ve Nuzzo, 2021).

Küresel sağlık güvenliği (GHS) endeksi

GHS Endeksi, ülkelerin hazırlık kapasiteleri ve riskleri ile ilgili temel verileri sağlayarak küresel sağlık güvenliği alanında önemli bir rol oynamaktadır. Ülkeler bu verileri hazırlıklı olma çalışmalarını geliştirmek için kullanabilir. Buna ek olarak uluslararası hükümet ve diğer küresel kuruluşlar, ülke düzeyindeki verileri sağlıkla ilgili acil durumlara daha iyi hazırlıklı olmak ve çalışmalarını desteklemek için kullanabilmektedir.

GHS Endeksi, 195 ülkede sağlık güvenliği ve ilgili yeterliliklerin bir değerlendirmesi ve karşılaştırmasıdır. GHS Endeksi, Nükleer Tehdit Girişimi (NTI) ve Bloomberg Halk Sağlığı Okulu'ndaki Johns Hopkins Sağlık Güvenliği Merkezi tarafından Economist Impact ile ortaklaşa geliştirilmiştir. Halk sağlığı yeterliliklerinin ölçülmesine yönelik başka yapılar da mevcut olmakla birlikte, GHS Endeksi, sınır ötesi sağlık tehlikelerinin azaltılmasına yönelik ülke gerekliliklerini düzenleyen küresel anlaşma olan Uluslararası Sağlık Tüzüğü'ne (UST [2005]) taraf olan 195 devletin tamamındaki hazırlık eksikliklerinin geniş bir değerlendirmesini

benzersiz bir şekilde sunmaktadır (Bell ve Nuzzo, 2021).

2021 GHS Endeksi, kamuya açık bilgileri kullanarak ülkeleri 6 kategori, 37 gösterge ve 171 soru üzerinden değerlendirmektedir. GHS Endeksi, sağlık güvenliğini, siyasi ve güvenlik riskleri, sağlık sisteminin daha geniş kapsamlı olarak sağlamlığı ve ülkelerin küresel normlara bağlılığı gibi salgınlarla mücadelede kritik öneme sahip diğer faktörler bağlamında değerlendirmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. GHS endeksinin evrimi (Bell ve Nuzzo, 2021)

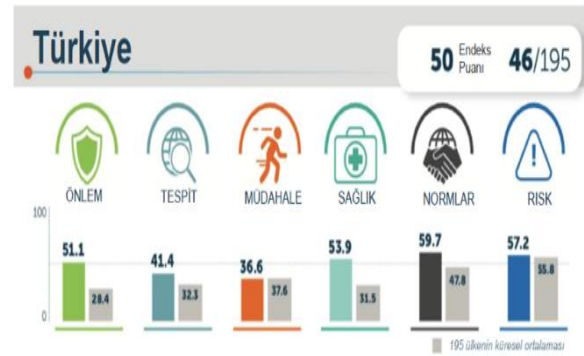
GHS Endeksi, liderleri, ülkelerini gelecekteki salgınlara hazırlamak için gerekli olan temel unsurlar ve planlamaya öncelik vermeleri ve dayanıklı finansmana yatırım yapmaları gereken noktalar hakkında bilgilendirmek üzere tasarlanmıştır. Bu yeterlilikleri her 2-3 yılda bir değerlendiren GHS Endeksi, bu eksikliklerin giderilmesine öncelik verilmesi için siyasi iradeyi ve eylemi teşvik etmektedir (Bell ve Nuzzo, 2021).

2021 GHS Endeksi'nin açıkladığı çarpıcı bazı sonuçlar şunlardır:

- Yüksek gelirli ülkeler de dahil olmak üzere çoğu ülke, salgın veya pandemi hazırlığını güçlendirmek için özel mali yatırımlar yapmamıştır.
- Çoğu ülke, salgın tespiti ve müdahalesi için sağlam, yetenekli ve erişilebilir bir sağlık sisteminin sürdürülmesinde çok az ilerleme kaydetmiş veya hiç ilerleme kaydetmemiştir.
- Siyasi ve güvenlik riskleri neredeyse tüm ülkelerde artmıştır ve en az kaynağa sahip olanlar en yüksek riske ve en büyük hazırlık eksikliklerine sahiptir.
- Ülkeler, olası hastalıklara karşı hazırlık ihtiyaçlarını ihmal etmeye devam etmekte, bu da sağlık güvenliği ile ilgili olası acil durumların etkisini daha da kötüleştirmektedir.

- Ülkeler, COVID-19'dan daha büyük ölçekte hasara yol açabilecek küresel felaket niteliğindeki biyolojik olayları önlemeye hazır değildir (Bell ve Nuzzo, 2021).

GHS Endeksi bulgularına göre 50. sırada yer alan Türkiye'nin GHS Endeksi puanı 50'dir. GHS Endeksi kategorilerinden biri olan tespit, laboratuvar sistemlerinin gücü ve kalitesi, laboratuvar tedarik zinciri, gerçek zamanlı gözetim ve uluslararası endişe yaratan olası salgınlara yönelik raporlama kapasitelerinde Türkiye açısından büyük eksiklikler olduğunu göstermektedir. Türkiye için GHS Endeksi kategorileri arasında en düşük puanı alan kategori tespit olmuştur (Şekil 2). Bu düşük performans, Türkiye'nin uluslararası endişe kaynağı olan potansiyel salgın hastalıkların erken tespiti ve raporlanması konusunda zorluk yaşadığını yansıtmaktadır (Bell ve Nuzzo, 2021).



Şekil 2. Türkiye'nin GHS endeks puanı (Bell ve Nuzzo, 2021).

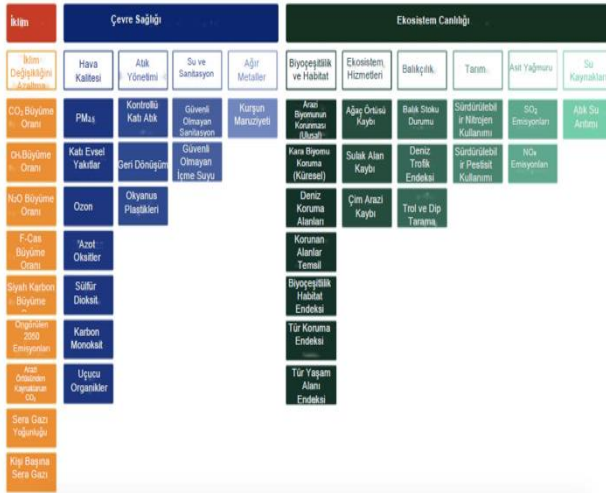
Tek sağlık uygulamalarının değerlendirilmesi: Çevre sağlığı

Tek Sağlık; insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre üçlüsünden oluşmaktadır, ancak söz konusu girişimlerin çoğunda çevre sağlığının yer almaması veya bu bileşene üstünlükü değinilmesinden de anlaşılacağı üzere çevre sağlığı genellikle ihmal edilmektedir. Çevre, antibiyotik direnci ve iklim değişikliği örneklerinde de görüldüğü üzere Tek Sağlık üçlüsünün en dinamik ve dolayısıyla en kafa karıştırıcı sektörüdür. İklim değişikliği patojenlerde, vektörlerde ve rezervuarlarda yaşam döngüsü değişikliklerine neden olarak, belirli bir habitatta etkileşim halinde olan türler arasındaki senkronizasyona etki ederek ve habitatları değiştirerek veya yok ederek canlı sistemlerin ekolojik ve çevresel bütünlüğünü tehlikeye atmaktadır (Essack, 2018). Kötü hava kalitesi, dünya çapında en kritik halk sağlığı sorunlarından bir tanesidir. Biyoçeşitlilik gezegen sağlığının kritik bir unsurudur ve insan toplumlarının, ekonomilerinin ve refahının işleyişini desteklemektedir. Tahminen bir milyon tür önümüzdeki on yıl içinde yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Kirlilik, karasal ve sucul ekosistemlerin sağlığını kötüleştirmenin yanı sıra

sucul yaşamı riske atmakta ve küresel su erişimini azaltmaktadır (Wolf ve ark., 2022). Bu nedenle, çevresel bileşenlerin ve disiplinlerin Tek Sağlık mimarisine daha iyi entegre edilmesine yönelik gerçek ve ciddi bir ihtiyaç vardır (Delesalle ve ark., 2022).

Çevresel performans endeksi (EPI)

2022 EPI, dünya genelinde sürdürülebilirliğin durumuna ilişkin verilere dayalı bir özet sunmaktadır. Bugüne kadar yayınlanmış en kapsamlı küresel çevre analizi olan 2022 EPI, 11 sorun kategorisinde gruplandırılmış 40 performans göstergesinden yararlanmaktadır. Bu sorun kategorileri de 3 politika hedefinde toplanmıştır: Çevre Sağlığı, Ekosistem Canlılığı ve İklim Değişikliği (Şekil 3). EPI ölçümlerini geniş çapta erişilebilir kılmak için EPI ekibi 180 ülkenin ham çevresel verilerini 0-100 ölçeğinde en kötü performanstan en iyi performansa doğru sıralanan göstergelere dönüştürmektedir. EPI göstergeleri, sorunları tespit etmek, hedefler belirlemek, trendleri izlemek, sonuçları anlamak ve en iyi politika uygulamalarını belirlemek için bir yöntem sağlamaktadır. Doğru veri ve gerçeklere dayalı analiz, hükümet yetkililerinin politika gündemlerini iyileştirmelerine, önemli statüdeki paydaşlarla iletişimi kolaylaştırmalarına ve çevre yatırımlarının getirisini en üst düzeye çıkarmalarına da yardımcı olabilmektedir (Wolf ve ark., 2022).

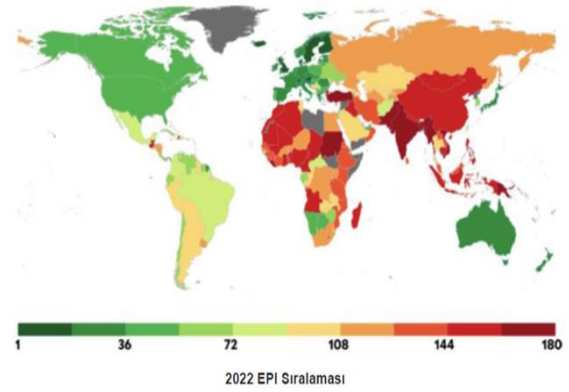


Şekil 3. 2022 EPI yapısı (3 politika hedefini, 11 konu kategorisini ve 40 göstergesi kapsamaktadır.) (Wolf ve ark., 2022).

2022 EPI çevresel başarı faktörlerini üç kategoride incelemektedir: (1) ekonomik, (2) yönetim ve (3) sosyal. Daha sonra bu faktörlerin sürdürülebilirliğin etkenlerini nasıl mümkün kıldığını araştırmakta ve bazı ülkelerin neden çevresel olarak benzerlerinden daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yüksek puan alan ülkeler, çevre sağlığını koruyan, biyoçeşitliliği ve habitatı muhafaza eden, doğal kaynakları koruyan ve sera gazı emisyonlarını ekonomik büyümeden ayıran politikalara uzun süredir devam eden yatırımlar yapmaktadır (Şekil 4).

Birçok Doğu Avrupa ülkesi yüksek puanlar elde ederken, Türkiye bir istisna olarak ortaya çıkmaktadır (Wolf ve ark., 2022).

Diğer birçok ülkenin çok altında, 172. sırada yer alan Türkiye'nin 2022 EPI puanı sadece 26.3'tür. Bu düşük performans, Türkiye'nin doğal kaynaklarını koruma çabasındaki ve artan sera gazı emisyonlarını azaltmadaki başarısızlığını yansıtmaktadır. EPI'nin inovatif göstergesi olan 2050'de öngörülen emisyonlar, Türkiye'nin yörüngesinde bir iyileşme olmazsa yüzyılın ortalarında sera gazı emisyonlarının en büyük 11. kaynağı olacağını göstermektedir (Wolf ve ark., 2022).



Şekil 4. 2022 Çevresel Performans endeksi'nde 180 ülke için sıralamalar (Wolf ve ark., 2022).

Buna ek olarak, Türkiye biyoçeşitliliği ve habitatı yeterince korunmamaktadır. Türkiye birçok biyolojik çeşitlilik sıcak noktasına ve benzersiz türlere ev sahipliği yapmasına rağmen, kara alanının %7'sinden azı ve deniz alanının %2'si korunan alanlar içerisindedir. Türkiye'nin İlisu Barajı gibi devasa altyapı projeleri, tehdit altındaki türler için kritik yaşam alanlarını tehlikeye atmakta ve Suriye, İran ve Irak gibi aşağı havza ülkelerinin su tedarikini sınırlandırmaktadır (Wolf ve ark., 2022).

2022 EPI veri analizinden iki temel sonuç ortaya çıkmaktadır: ekonomik güç ve iyi yönetimin önemi. Çevrenin korunmasına yatırım yapılmasını sağlayan ekonomik güç, ülkelerin çevreyle ilgili altyapıyı geliştirmesine ve daha iyi kirlilik kontrol teknolojileri benimsemesine olanak tanıyarak daha yüksek EPI puanları elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yatırımlar halk sağlığını iyileştirmekte ve daha iyi çevresel sonuçlara yol açmaktadır (Wolf ve ark., 2022).

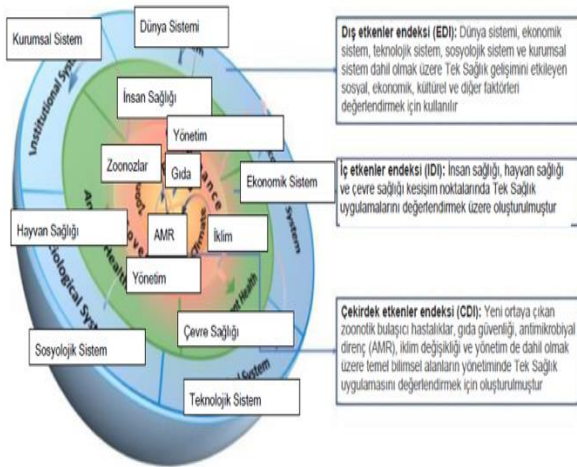
Tek sağlık uygulamalarının değerlendirilmesi: İnsan-hayvan-çevre sağlığı

Tek Sağlık vizyonunun uygulanmasının sonuçları, özellikle zoonotik ve yeni ortaya çıkan hastalıkların etkisinin en şiddetli şekilde yaşandığı gelişmekte olan ülkelerde çok yönlü olmaktadır. Örneğin, insan, hayvan ve çevre sağlığı uzun vadeli ekonomik refah, dış yardım bağımlılığının azaltılması ve siyasi istikrar için vazgeçilmez önemdedir (Mwangi ve ark., 2016).

Küresel tek sağlık endeksi (GOHI)

İnsan, hayvan ve çevre sağlığı arasındaki ayrılmaz bağlantılar, Tek Sağlık için bir sistem yaklaşımını gerekli kılmaktadır. Bu yaklaşım, sağlığın moleküler, biyolojik, ekolojik, ekonomik, sosyal, politik ve siyasi sistemler içinde kompleks bir yapıdan meydana geldiğini kabul etmektedir (Essack, 2018). İnsan-hayvan-çevre sisteminin bir bütün olarak daha iyi hale getirilmesi, üçünden (insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre sağlığı) herhangi birinin faydalarından ödün vermemekle mümkündür. Tek Sağlık etkilerini değerlendirecek yöntemlerin geliştirilmesi Tek Sağlık yaklaşımının bilimsel olarak ölçülmesine, Tek Sağlık kapasitesinin geliştirilmesine ve en acil ihtiyaç duyulan alanlardaki boşlukların tespit edilmesine katkıda bulunmak açısından büyük önem taşımaktadır. Tüm ülkelerin karar alma süreçlerinde Tek Sağlık yaklaşımını benimsemesine ve uygulamasına acil ihtiyaç duyulmaktadır. Etkili karar almaya yönelik ihtiyaçların artmasıyla birlikte, Tek Sağlık yaklaşımının nicel olarak değerlendirilmesine yönelik birçok küresel çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmalar, Tek Sağlık yaklaşımını oluşturan tüm bileşenlerden ziyade, Tek Sağlık yaklaşımının bileşenlerinden birine odaklanmıştır (Zhang ve ark., 2022).

GOHI, Tek Sağlık'ın bütüncül bir perspektiften değerlendirilmesi için geliştirilen ve geniş kapsamlı analiz için 200'den fazla ülke ve bölgeden veri kullanan dünyanın ilk değerlendirme yöntemidir. Yapılandırılmış anket puanlarını (örneğin GHSI) veya yalnızca nicel verileri (örneğin EPI) kullanan mevcut küresel veri tabanlarının aksine GOHI, veri toplama ve analizinde karma yöntem yaklaşımıyla nitel ve nicel verileri bir araya getirmekte, bu durum da GOHI'yi daha esnek ve farklı ülkelerdeki farklı durumlara uygulanabilir kılmaktadır (Zhang ve ark., 2022).



Şekil 5. Küresel Tek Sağlık Endeksi'nin (GOHI) hücre benzeri yapısı (Zhang ve ark., 2022).

Tek Sağlık'ın bu temel ilkelerine dayanarak, bir dış etkenler endeksi (EDI), bir iç etkenler endeksi (IDI) ve bir çekirdek etkenler endeksinden (CDI) oluşan hücre benzeri bir GOHI yapısı geliştirilmiştir (Şekil 5). EDI, dünya sistemi, ekonomik sistem, teknolojik sistem, sosyolojik sistem ve kurumsal sistem dahil olmak üzere Tek Sağlık gelişimini etkileyen sosyal, ekonomik, kültürel ve diğer faktörleri değerlendirmek için kullanılır. IDI, insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre sağlığı etkileşimlerindeki Tek Sağlık uygulamalarını değerlendirmek için oluşturulmuştur. CDI, yeni ortaya çıkan zoonotik bulaşıcı hastalıklar, gıda güvenliği, antimikrobiyal direnç (AMR), iklim değişikliği ve yönetim gibi temel bilimsel alanların yönetiminde Tek Sağlık uygulamasını değerlendirmek üzere oluşturulmuştur (Zhang ve ark., 2022).

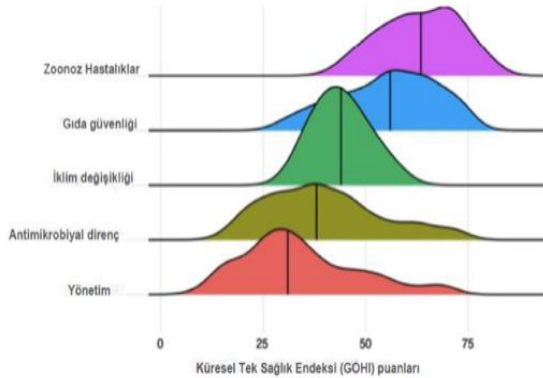
2016-2020 yılları arasında üretilen veriler, her bir gösterge için toplanmış ve GOHI veri tabanını oluşturmak için kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. GOHI'nin geliştirilmesi için kullanılan veri kaynakları (Zhang ve ark., 2022).

Kategori	Kaynaklar
Dış etkenler endeksi (EDI)	FAO, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), Dünya Bankası, Our World in Data, Uluslararası Enerji Ajansı (IEA), Uluslararası Telekomünikasyon Birliği (ITU) veri tabanları
İç etkenler endeksi (IDI)	Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri (SDGs), WHO-Küresel Sağlık Gözlemi, IHME-Küresel Hastalık Yükü (GBD), Dünya Bankası, Çevresel Performans Endeksi (EPI), FAO, Küresel Okyanus Sağlığı Endeksi puanları, Our World in Data veri tabanları
Çekirdek etkenler endeksi (CDI)	Yönetim: SDG'lerden alınan veriler Dünya Bankası, hükümet web sitesi portali Zoonotik hastalıklar: DSÖ, OIE, Dünya Bankası, Küresel Sağlık Güvenliği Endeksi (GHS), GHDx verileri Gıda güvenliği: FAO, Dünya Bankası, WHO, BM, UNHCR, UNEP'ten alınan veriler Antimikrobiyal direnç: Küresel antimikrobiyal direnç ve kullanım gözlemi sistemi (GLASS), GHS, Üçlü AMF Ülke Öz Değerlendirme Anketi (TrACSS), Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi, Pan Amerikan Sağlık Örgütü (PAHO)/WHO verileri
İklim değişikliği	Dünya Bankası, Lancet Countdown, Our World in Data, OECD Stat'dan alınan veriler

GOHI sonuçlarına göre, dünya genelindeki ülkelerin/bölgelerin GOHI puanları optimumdan (100 puan) uzak olup, en yüksek puan 65'tir (İsveç). En yüksek puan aralığı olan 60 ve üzeri ağırlıklı olarak Kuzey Amerika, Avrupa ve Okyanusya ülkelerini içerirken, Afrika'daki ülkeler 30-50 aralığında oldukça düşük puanlar elde etmiştir. Hücre benzeri bir yapıya dayanan CDI beş bileşenden oluşmaktadır. Şekil 6, GOHI puanlarına göre sıralanan CDI boyutlarının medyanlarına göre aşağıdaki gibi olduğunu göstermektedir: zoonotik hastalıklar (63.7), gıda güvenliği (56.3), iklim değişikliği (43.6), AMR (37.8) ve Tek Sağlık yönetimi (31.5). Buna ek olarak, AMR ve Tek Sağlık yönetimi için puan dağılımları geniş aralığa sahiptir ve bu durum ülkeler/bölgeler arasında puanlarda büyük bir varyasyon olduğunu göstermektedir. FAO, WHO ve OIE tarafından 2021 yılında ortaklaşa oluşturulan Üçlü AMR Ülke Öz Değerlendirme Anketine göre, dünya çapında 153 ülke AMR konusunda ulusal eylem kılavuzları yayınlamıştır, ancak yalnızca 95 ülke kılavuzlara göre uygulamaları

hayata geçirmiştir ve 70'ten fazla ülkede hala AMR konusunda resmi sektörler arası yönetim veya koordinasyon mekanizmaları bulunmamaktadır (Zhang ve ark., 2022).



Şekil 6. Küresel Tek Sağlık Endeksi'nin (GOHI) puan dağılımı. Temel Etkenler Endeksinin (CDI) beş bileşenine göre ülkeler arasında alt grup GOHI puanlarının yoğunluk grafikleri (Zhang ve ark., 2022).

Bir değerlendirme aracı olarak GOHI, Tek Sağlık uygulamalarının sağlık sonuçlarına etkisini tahmin etmek için uygulanabilir; bu durum, kaynak girdisinin önceliklendirilmesine ve ilgili stratejilerin formüle edilmesine fayda sağlar. İlk olarak, GOHI'nin hücre benzeri yapısı tanımlanarak, Tek Sağlık yaklaşımının belirleyicileri ve işleyişi hakkında net bir tanım sağlanmakta ve ortak bir anlayış teşvik edilmektedir. Bu aşama stratejilerin geliştirilmesi için güçlü bir temel oluşturur. İkinci olarak, GOHI küresel, kıtasal, ülke ve alt-bölgesel düzeylerde Tek Sağlık yaklaşımlarının performansının değerlendirilmesi için bir araç olarak hizmet edebilmektedir. En çok ihtiyaç duyulan ülkelerde/bölgelerde Tek Sağlık uygulamalarını güçlendirmek için boşlukları belirlemek ve etkili önlemlerin benimsenmesi için katkı sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2022).

SONUÇ

Tek Sağlık konsepti, herkes için sağlığın iyileştirilmesinde en büyük etkiye sahip olmak amacıyla hayvan-insan-ekosistem etkileşimindeki halk sağlığı sorunlarını ele almak için kritik bir araç olarak kabul görmeye devam etmektedir (Atlas ve Maloy, 2016). Şu ana kadar çoğu ülke, faaliyetler ve harcamalar konusunda farklı yetkilere sahip devlet kurumlarında veya bakanlıklarda bulunan insan sağlığı, tarım ve çevre sektörlerindeki faaliyetlerin koordinasyonu ve entegrasyonu için resmi mekanizmalardan yoksundur (Kelly ve ark., 2020). Ayrıca, çok az ülke Tek Sağlık yaklaşımının koordinasyonundan özel olarak sorumlu bir devlet kurumu oluşturmuştur. Yönetim mekanizmalarının eksikliği, Tek Sağlık için farklı düzeylerde kapasite geliştirilmesinin önündeki en büyük engel olmaya

devam etmektedir (Zhang ve ark., 2022). Birçok ülke Tek Sağlık uygulamalarını gerçekleştirmek için kapasitelerini hızla geliştirebilmiş olsa da tüm ülkeler salgın ve pandemik hastalıklar gibi gelecekteki halk sağlığı tehditlerine karşı tehlikeli bir şekilde hazırlıksız durumdadır. Bununla birlikte, hazırlıklı olma konusunda uzun vadeli kazanımlar elde etmek amacıyla yeni kapasiteleri daha dayanıklı hale getirmek için büyük bir fırsat bulunmaktadır (Bell ve Nuzzo, 2021).

Çıkar Çatışması

Yazar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarlama: PS; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** PS.

KAYNAKLAR

- Atlas, R. M. & Maloy, S. (2016). One Health: People, Animals, and the Environment. *Emerging Infectious Diseases*, 22(4), 766–767. <https://doi.org/10.3201/eid2204.151887>.
- Bell, J. A. & Nuzzo, J. B. (2021). Global Health Security Index: Advancing Collective Action and Accountability Amid Global Crisis. www.GHSIndex.org.
- Bronzwaer, S., Geervliet, M., Hugas, M. & Url, B. (2021). EFSA's expertise supports One Health policy needs. *EFSA Journal*, 19(5), e190501. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.e190501>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)/One Health. <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>.
- Delesalle, L., Sadoine, M. L., Mediounia, S., Denis-Robichaud, J., Zinszer, K., Zarowsky, C., Aenishaenslina, C. & Carabin, H. (2022). How are large-scale One Health initiatives targeting infectious diseases and antimicrobial resistance evaluated? A scoping review. *One Health*, 14, 100380. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100380>.
- Essack, S. Y. (2018) Environment: the neglected component of the One Health triad. *Comment*, 2(6), e238-e239. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30124-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30124-4).
- Kelly, T. R., Machalaba, C., Karesh, W. B., Crook, P. Z., Gilardi, K., Nziza, J., Uhart, M. M., Robles, E. A., Saylor, K., Joly, D. O., Monagin, C., Mangombo, P. M., Kingebeni, P. M., Kazwala, R., Wolking, D., Smith, W. & Mazet, J. A. K. (2020). Implementing One Health approaches to confront emerging and re-emerging zoonotic disease threats: lessons from PREDIC. *One Health Outlook*, 2:1. <https://doi.org/10.1186/s42522-019-0007-9>.
- Mwangi, W., de Figueiredo, P. & Criscitiello, M. F. (2016). One Health: Addressing Global Challenges at the Nexus of Human, Animal, and Environmental Health. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005731. doi:10.1371/journal.ppat.1005731.
- National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). <https://www.cdc.gov/ncezid/index.html>

- One Health High-Level Expert Panel (OHHLEP) Annual Report 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/one-health-high-level-expert-panel-annual-report-2021>.
- Rüegg, S. R., Häslar, B. & Zinsstag, J. (2018). Integrated approaches to health: A handbook for the evaluation of One Health. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, ISBN: 978-90-8686-324-2.
- Sinclair, J. R. (2019). Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(1), 145–154. doi: 10.20506/rst.38.1.2949.
- Wolf, M. J., Emerson, J. W., Esty, D. C., de Sherbinin, A., & Wendling, Z. A. (2022). 2022 Environmental Performance Index. New Haven, CT: Yale Center for Environmental Law & Policy. epi.yale.edu.
- Zhang, X. X., Liu, J. S., Han, L. F., Xia, S., Li, S. Z., Li, O. Y., Kassegne, K., Li, M., Yin, K., Hu, Q. Q., Xiu, L. S., Zhu, Y. Z., Huang, L. Y., Wang, X. C., Zhang, Y., Zhao, H. Q., Yin, J. X., Jiang, T. G., Li, Q., Fei, S. W., Gu, S. Y., Chen, F. M., Zhou, N., Cheng, Z. L., Xie, Y., Li, H. M., Chen, J., Guo, Z. Y., Feng, J. X., Ai, L., Xue, J. B., Ye, Q., Grant, L., Song, J. X., Simm, G., Utzinger, J., Guo, X. K. & Zhou, X. N. (2022). Towards a global One Health index: a potential assessment tool for One Health performance. *Infectious Diseases of Poverty*, 11, 57. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-00979-9>.



DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1158751>



Sucul Ortamlarda Nanopartikül Toksikitesi

İlker ŞİMŞEK¹, Özgür KUZUKIRAN², Ayhan FİLAZİ³

¹ Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

² Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Veterinerlik Bölümü

³ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 07.08.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 16.09.2022

ÖZ

Nanopartiküller (NP'ler) 1 ile 100 nm arasında bulunan partiküllere verilen isimdir. NP'ler normal malzemelerden farklı belirli fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı ticari kullanım için yapay olarak sentezlenmekte, endüstriyel üretim esnasında kasıtsız bir yan ürün veya doğal olarak meydana gelmektedir. Her gün gelişmekte olan nanoteknoloji, elektronik, tıp, inşaat, kozmetik, tekstil, otomotiv, çevre, gıda, ev aletleri, yenilenebilir enerji, petrol, tarım, matbaacılık, spor ve sağlık gibi alanlarda kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan NP'ler ise gümüş (Ag), titanyum (Ti) ve silikon dioksit (SiO₂) veya karbon (C) tabanlı olanlardır. Ticari olarak üretilen NP'ler, üretim aşamalarında veya yaşam döngülerinin son aşamasında atık ürünler olarak sucul ortama deşarj edilebilmektedir. Bu NP'ler yüzey veya yeraltı suyu ortamlarına geçebilmektedir. Su kaynaklarına doğrudan, yağış veya topraktan süzülüp gelen NP'ler balık, kabuklular ve hatta tek hücreli organizmalar gibi sucul organizmalara yönelik önemli etkilere neden olabilmektedirler. Sucul organizmalar NP'lere solungaçları, yutma, dermal temas, hücrelere adsorpsiyon gibi yollarla maruz kalmaktadırlar. NP'ler canlılarda lipid peroksidasyonuna, hücre yapısının bozulmasına, mitokondride bozulmaya, protein oksidasyonuna ve DNA hasarı gibi etkilere neden olmaktadır. NP'ler çevresel risk değerlendirmeleri çoğunlukla tüm risk faktörlerini dikkate almayan standart laboratuvar koşulları altında gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle çevre ve atık su ortamları gibi karmaşık ortamlara salınan NP'lerin bu ortamlardaki davranışları laboratuvar ortamından farklı olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Nano Teknoloji, Toksikite, Suda Yaşayan Canlılar.

Nanoparticle Toxicity in Aquaculture

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are the name given to particles that exist between 1 and 100 nm. NPs are synthesized artificially for commercial use due to certain physical and chemical properties different from normal materials, occur as an unintentional by-product during industrial production, or occur naturally. Nanotechnology, which is developing every day, is used in fields such as electronics, medicine, construction, cosmetics, textiles, automotive, environment, food, household appliances, renewable energy, petroleum, agriculture, printing, sports and health. The most commonly used NPs are those based on silver (Ag), titanium (Ti), and silicon dioxide (SiO₂) or carbon (C). Commercially produced NPs can be discharged into the aquatic environment as waste products during the production stages or at the final stage of their life cycle. These NPs can migrate to surface or groundwater environments. NPs that leach into water sources directly from precipitation or soil can cause significant effects on aquatic organisms such as fish, crustaceans and even single cell organisms. Aquatic organisms are exposed to NPs through gills, ingestion, dermal contact, and adsorption to cells. NPs cause effects such as lipid peroxidation, disruption of cell structure, deterioration in mitochondria, protein oxidation and DNA damage in living things. Environmental risk assessments of NPs are often performed under standard laboratory conditions that do not consider all risk factors. Because of that the behavior of NPs released into complex environments such as environment and wastewater environments may be different from the laboratory environment.

Keywords: Nanoparticle, Nano Technology, Toxicity, Aquatic Creatures.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İlker ŞİMŞEK, Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Çankırı, Türkiye
E-mail: ilkers@karatekin.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Şimşek, İ., Kuzukıran, Ö., Filazi, A. (2022). Sucul ortamda nanopartikül toksisitesi. *BAUN Sağ Bil Derg*, 11(Supplement 1): 59-63. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1158751>



BAUN Health Sci J 2022 OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) Teknik komitesi 229, 2010 yılında nanoteknolojiyi (NT) “1-100 nm nano ölçekteki nesnelere ve organizmaları bilmek ve kullanmak” olarak tanımlamıştır (Ruttkey-Nedecky ve ark., 2018). Nanopartiküller (NP), en az bir boyutu 1 ile 100 nm arasında olan malzemeler olarak tanımlanır. NP'lerin, normal malzemelerinden farklı belirli fiziko-kimyasal özellikleri bulunmaktadır (Lopez-Serrano ve ark., 2014). Bu parçacıklar küresel, boru şeklinde veya düzensiz formda olabilir. NP'ler, doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılır. Bu iki grup da NP'lerin kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik (mineral) olmak üzere alt gruplara ayrılır (Taghavi ve ark., 2013).

Hem organik hem de inorganik NP'ler, potansiyel kirleticiler olabilirler. Geçmişte analitik tekniklerdeki sınırlamalar nedeniyle çoğunlukla tanımlanamamışlardır. NP'ler ticari kullanım için yapay olarak sentezlenebilir, kasıtsız bir yan ürün olarak üretilebilir veya doğal olarak meydana gelebilirler. Biyosfer, antropojenik nano boyutlu parçacıklar ve diğer doğal NP'ler açısından zengindir (Malakar ve ark., 2021). Volkanik külden, orman yangınlarından, yıldırımdan veya uzayda oluşan doğal NP'ler havada kolayca bulunabilir. Kurumdan üretilen doğal olarak oluşan çok duvarlı karbon nanotüpler, havada 15 ile 70 nm arasında değişen boyutlarda bulunmuştur (Griffin ve ark., 2018). Antropojenik endüstriyel süreçlerin (örneğin dizel egzozu, kömür yakma ve kaynak dumani) sonucu oluşan, atık veya antropojenik partiküller olarak da tanımlanan kasıtsız üretilen NP'lerdir (Ma ve ark., 2016). NP'lerin sentezi için fiziksel, kimyasal ve çevre dostu yeşil sentez yöntemleri kullanılmaktadır. Her yöntemin kendine özgü artıları ve sınırlamaları bulunmaktadır (Andaç ve ark., 2022). NP'ler, kimyasal bileşime bağlı olarak karbon NP'ler (fullerenler ve nanotüpler), metal oksitler (titanium dioksit (TiO₂) ve çinko oksit (ZnO)), metal NP'ler (altın (Au)), yarı iletkenler (kuantum noktaları) ve organik polimerik NP'ler (dendrimerler) olarak gruplandırılır (Krysanov ve ark., 2010).

NT veri tabanında 7 Ocak 2022 tarihi itibariyle elektronik, tıp, inşaat, kozmetik, tekstil, otomotiv, çevre, gıda, ev aletleri, yenilenebilir enerji, petrol, tarım, matbaacılık, spor ve sağlık ile diğer olmak üzere 15 sınıfta toplam 9471 nano ürün olduğu ve bu sınıflarda en yaygın kullanılan NP'lerin ise gümüş (Ag), titanyum (Ti) ve silikon dioksit (SiO₂) veya karbon (C) tabanlı olanlar olduğu görülmektedir (Filazi ve Şimşek, 2022).

NP'ler, boyutları, dağılımları ve morfolojileri nedeniyle benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip bir tür nanomalzemedir (NM) (Haghighat ve ark., 2021). NP'lerin büyük oranda uygulamaları, normal malzemeler ve bunların tuzlarına kıyasla çok yüksek yüzey alanı/hacim oranı, daha yüksek reaktivite, yüzey potansiyeli,

ayarlanabilir fiziksel/kimyasal özellikler, moleküler manipülasyon vb. gibi benzersiz özellikleri nedeniyle mümkündür ve tercih edilir (Ameen ve ark., 2021). Yukarıda bahsedilen olağanüstü özellikleri nedeniyle NT, en hızlı büyüyen teknolojik sektörlerden biridir ve yüksek ekonomik etkiye sahiptir (Lopez-Serrano ve ark., 2014). Ticari olarak üretilen NP'ler, üretim aşamalarında veya yaşam döngülerinin son aşamasında atık ürünler olarak sucul ortama deşarj edilebilir. Bu NP'ler yavaş yavaş yüzey ve yeraltı suyu ortamlarına geçebilir veya daha sonra bitkiler veya hayvanlar tarafından alınmak üzere toprakta kalabilirler. Atık su, NP'leri doğal çevreye dağıtmak için birincil vektörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Malakar ve ark., 2021).

NP çeşitlerinin günden güne artması ve hücreler üzerindeki keşfedilmemiş etkileşim mekanizmaları nedeniyle, fitotoksik, sitotoksik ve genotoksik özelliklerinin belirlenmesi de dahil olmak üzere organizmalar üzerindeki potansiyel zararlı etkileri için sürekli testler yapılmaktadır (Długosz ve ark., 2021). NP'lerin ekotoksikolojik etkilerinin ve toksisitesinden sorumlu içsel ve dışsal faktörlerin (boyut, kimyasal bileşim, şekil, eğrilik açısı, kristal yapı, yüzey pürüzlülüğü, hidrofobiklik vb.) araştırılması önem arz etmektedir (Bakshi ve ark., 2014). Nanoteknolojinin yaygınlaşmasıyla, bu NP'lerin büyük miktarları yüzey sularına ve bu yolla sucul ortamlara deşarj edilmektedir. Bu da sucul biyota üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Birbirleriyle veya diğer kirleticilerle birlikte bulunan NP'lerin toksisite mekanizmaları ve davranışları, su veya canlı organizmalardaki birikimlerini de değiştirebilmektedir (Haghighat ve ark., 2021).

Su kaynaklarına doğrudan, yağış veya topraktan süzülüp gelen NP'ler balık, daphnia ve hatta tek hücreli organizmalar gibi sucul organizmalara yönelik önemli etkilere neden olabilmektedirler. Sucul organizmalar NP'lere solungaçları, yutma, dermal temas, hücrelere adsorpsiyon gibi sürekli temas etmek zorunda kaldıklarından karadaki organizmalardan daha fazla NP toksisitesine maruz kalırlar. Sucul canlılarda birikim gösteren NP'ler diğer türlere gıda zinciriyle geçmekte ve böylece her ekosistemdeki tüm trofik seviyeleri etkilemektedirler (Filazi ve Şimşek, 2022).

GENİŞLEME

NP'ler, memelilerin farklı hücre zarlarından geçebilir ve emilebilir. Emilim oranları boyutlarına bağlıdır. Daha sonra NP'lerin boyutu ve hücrelerdeki dağılımı, agregasyonu ve sedimentasyonları, absorpsiyon oranlarını belirlemede en önemli parametrelerdir. Bazı özel hücrelerde, nanopartiküllerin hücresel absorpsiyonu endositoz veya fagositoz ile gerçekleşir. NP'ler, hücrelerde mitokondri gibi belirli yerlerde depolanır ve toksik reaksiyonlara neden olabilmektedirler. NP'ler, çok hücreli organizmalarda iltihaplanma ve fibroze neden olabilir ve tek hücreli

organizmalardaki ana etkileri, antioksidan özellikleri ve sitotoksisiteleleridir (Taghavi ve ark., 2013).

NP'ler, geniş yüzey alanına sahip olduklarından membranlara, proteinlere ve DNA'da önemli hasarlara neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olurlar. Bir organizmada ROS ($-O_2$, HO_2 , $-OH$ ve H_2O_2 gibi) türlerinin üretiminde artış olması, "nanotoksosite fenomeni" adı verilen lipid peroksidasyonuna, hücre yapısının bozulmasına, mitokondride bozulmaya, protein oksidasyonuna ve DNA hasarına neden olabilmektedir (Filazi ve Şimşek, 2022).

Toplanma eğilimi ve suda belirli bir dereceye kadar zayıf çözünürlük, canlı organizmalar için NP'lerin çoğunun erişilebilirliğini sınırlar. Fullerenlerin sulu ortamda ve toprakta en azından düşük hareketlilik gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı veriler, deri yoluyla, hava yoluyla veya su ve gıda ile girebilecekleri hayvan ve insan vücutlarına nüfuz ettiklerini göstermektedir (Krysanov ve ark., 2010).

NP'ler sadece pulmoner sistemler gibi temas yerlerinde değil, aynı zamanda fizyolojik bariyerlere nüfuz edebilir ve böylece kardiyovasküler sistemler ve beyin gibi sistemik organlarda olumsuz etkilere neden olabilmektedirler (Chen ve ark., 2016). Suda yaşayan organizmalarla yapılan deneylerle, bir ortamda NP'lerin varlığının doğurganlığın azalmasına, fizyolojik değişikliklere, davranış anormalliklerine ve ölüm oranının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Krysanov ve ark., 2010).

Xiong ve arkadaşları (2011) nano ölçekli titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO), zebra balığında akut toksisitesi ve oksidatif etkilerini araştırmışlardır. TiO_2 NP'lerinin (96 saatlik LC_{50} , 124,5 mg/L) akut toksisitesi esasen toksik olmayan TiO_2 'den daha fazla bulunmuştur. 5 mg/L ZnO NP'lerine ve ZnO 'ya maruz kalan balıkların karaciğerindeki malondialdehit seviyeleri yükselmiştir (kontrol gruplarına göre sırasıyla %204.2 ve %286.9'u). Ek olarak, bağırsak dokuları, NP süspansiyonlarına maruz kaldıktan sonra oksidatif etkiler sergilemiştir (Xiong ve ark., 2011).

Chen ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada graphene oxide (GO) konsantrasyonu 50 mg/L'ye ulaştığında zebra balığı embriyolarında hücre büyümesini inhibe ederek zebra balığı için potansiyel çevresel riske sahip olduğu görülmüştür (Chen ve ark., 2012).

Paital ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada tatlı su balığı *Anabas testudineus*, GO'nun neden olduğu toksik etkileri değerlendirmek için model balık olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, GO'nun, artan lipid peroksit birikimi, enzim aktivitesi, azaltılmış toplam kırmızı kan hücresi sayısı ve protein seviyesi değişiklikleri ile kanıtlanan, tatlı su balıklarında hücre ve mitokondri içinde oksidatif stresi indükleyebileceği ortaya konmuştur (Paital ve ark., 2019).

Zebra balığı erken embriyogenezinde fulleren C_{60} ve C_{70} 'in embriyotoksitesitesi ve genotoksitesitesi, embriyolardaki malformasyonlarda önemli artış ve

yüksek fulleren konsantrasyonlarında (200 $\mu g/L$) ölüm meydana getirmiştir. Ayrıca, modifiye edilmemiş fullerenlerin, hidroksillenmiş varyantlardan daha toksik olduğu bulunmuştur (Krysanov ve ark., 2010).

Yalsuyi ve Vajargah (2017)'in farklı gümüş nanoparçacık konsantrasyonu aralığında 24, 48, 72, 96 saatlik akut toksisite çalışması sonucu, Kızılğöz Balığı (*Rutilus rutilus*) için Ag NP toksisitesi (6.590 ml/L) ile Japon Balığı (*Carassius auratus*) (11.2 ml/L) ile karşılaştırıldığında, önemli bir fark olduğunu göstermiştir. Ayrıca sonuçlar Ag NP'lerin balık türleri için oldukça toksik olduğu belirtilmiştir (Yalsuyi ve Vajargah, 2017).

Ateş ve arkadaşları (2013) düşük ve yüksek konsantrasyonlarda TiO_2 NP'lere maruz kalmanın Japon balığı (*Carassius auratus*) üzerindeki ölümcül etkilerini araştırmışlardır. TiO_2 NP birikimi bağırsakta 42.71 ppb'den 110.68 ppb'ye ve japon balıklarının solungaçlarında 4.10 ppb'den 9.86 ppb'ye, artan maruziyet dozu ile 10 mg/L'den 100 mg/L TiO_2 NP'lerine yükseldiği bulunmuştur. Balığın kaslarında ve beyinde önemli bir birikim tespit edilmediği bildirilmiştir (Ateş ve ark., 2013).

Jovanovic ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, zebra balığı embriyolarına, tasarlanmış nanopartikülleri (TiO_2 ve hidroksillenmiş fullerenler/ $C_{60}(OH)_{24}$) sublethal dozda otik vezikül içine enjekte etmişlerdir. NP'lerin genlerin ekspresyonunu değiştirme potansiyelini belirlemek için enjekte edilen ve kontrol embriyoları üzerinde bir dizi analiz yapılmıştır. Analizler sonucunda sirkadiyen ritim, kinaz aktivitesi, veziküler taşıma ve bağışıklık tepkisinde yer alan genler üzerinde gen regülasyonu üzerinde önemli etkiler gözlenmiştir (Jovanovic ve ark., 2011).

Bazı balık türlerinde metalik NP'ler çözülmüş formlardan daha toksik olabilmektedir. Genç zebra balıklarında, bakır (Cu) NP'ler için 0.71mg/L'de ve çözülmüş Cu için 1.78 mg/L'de LC_{50} 'ye ulaşılmıştır. Bu NP'lerin akciğer toksisitesi, doku elementlerinin bozulması, Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonu ve oksidatif stres gibi ölümcül olmayan etkilere neden olduğunu göstermektedir. Nanometallerden kaynaklanan organ patolojileri, solungaç, karaciğer, bağırsak ve beyin gibi çeşitli organlarda bulunabilmektedir (Shaw ve Handy, 2011).

İmani ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada üç grup, 0.1 mg/l Ag NP solüsyonu (T1), 0.2 mg/l Ag NP (T2) ve 0.4 mg/l Ag NP (T3) verilen gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) ve kontrol grubunu içermektedir. Deneyin dördüncü ve sekizinci günlerinde, kırmızı kan hücreleri (RBC)'lerin ve beyaz kan hücreleri (WBC)'lerin değerleri tüm tedavilerde kontrol grubundakilerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Sekizinci günde T3 grubundaki hemotokrit (Hct), kontrol grubuna göre daha düşük değerler göstermiştir. İlk kan örneklemeğinde T2 ve T3 gruplarında hemoglobin (Hb) konsantrasyonları kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen,

T3 grubu için ikinci örneklemede Hb değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Karaciğer enzimlerinin (ALT, AST, ALP ve LDH) konsantrasyonları, tüm tedavi gruplarında kontrol grubundakilerden daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, Ag NP'lerin gökkuşağı alabalığının hematolojik parametrelerinde önemli değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Imani ve ark., 2015).

Daphnia magna veya *Thamnocephalus platyurus* gibi kabuklular da NP'lerin potansiyel zararlı etkilerini test etmek için, bazen karşılık gelen metal toksisiteleriyle karşılaştırıldığında kullanılmıştır. *Daphnia magna*'da gümüş nitrat (AgNO₃) esas olarak üremeyi etkilemiştir ve 20 nm Ag NP'ler büyümeyi etkilemiştir (Zhao ve Wang, 2010).

Kachenton ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada, histopatolojik inceleme ile Ti NP'lerin 24 saatlik LC₅₀'sini belirleyerek, doğal su kaynakları için tehlikeli etkileri temsil eden su canlıları üzerindeki Ti NP toksisitelerini araştırmışlardır. Model olarak tuzlu su kidesi (*Artemia salina*) seçilmiştir. On yetişkin *A. salina*, üç grup halinde çeşitli Ti NP konsantrasyonları ile 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. *A. salina*'nın ölüm sayısı kaydedilmiş ve LC₅₀ değeri hesaplanmıştır. LC₅₀ sonucu 1693,43 mg/L bulunmuştur. Daha sonra, %25 LC₅₀ Ti NP ile 24 saat inkübasyondan sonra canlılar seçilerek *A. salina*'nın histopatolojik incelemesi yapılmıştır. Doku işleme, kesit alma ve hemotoksilen eozin (H&E) ile boyanan prepatlar ışık mikroskopunda incelenmiştir. Histopatoloji, bağırsak yolu boyunca Ti NP oklüzyonunu ortaya koymuştur. Epitel hücreleri hiperplazi, villus deformasyonu, düzensiz dizilim, şiddetli ödem ve nekroz alanı gibi anormal morfoloji göstermiştir (Kachenton ve ark., 2019).

NP'lerin karakterizasyonu, uygulamaları, absorpsiyon ve toksikoloji ile ilgili araştırmalar için önemli bir husustur. NP'lerin matriks, analit, konsantrasyon, karmaşıklık ve doğal özellikleri temelinde karakterizasyonu için farklı yöntemler kullanılmaktadır. NP'lerin çeşitli karakterizasyon yöntemleri rapor edilmiş ve yaygın olarak kullanılmaktadır. NP'lerin karakterizasyonu boyut ve şekle göre ayırma yöntemlerine dayanmaktadır. Ayırma yöntemi için kullanılan ilk teknikler santrifüjleme ve ultrafiltrasyondur. Ancak bu yöntemler boyutu 10 nm'den küçük NP'ler için kullanılamamaktadır. HPLC, en güvenilir ayırma yöntemidir. Bu aşamadan sonra istenilen NP'ler üzerinde jel elektroforez ve kapiler elektroforez yapılmaktadır (Lopez-Serrano ve ark., 2014). Mikroskopi, standart malzeme ile herhangi bir karşılaştırma yapmadan istenen NP'lerin şeklini, boyutunu ve partikül agregasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır (Daniel ve Astruc, 2004). Spektrometrik yöntemler, NP'lerin karakterizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir. UV-VIS spektrometrisi, partikül agregasyonu ve ortalama

partikül boyutu temelinde NP'lerin araştırılmasında kullanılmaktadır (Overbeck ve ark., 2008).

NP'lerin risk değerlendirmesinde iki metod kullanılmaktadır. Bunlardan ilki maruziyet verileri kullanılarak yapılan nicel risk değerlendirmesi ikincisi ise maruziyet verilerine ulaşma olanağı bulunmayan durumlarda yapılan nitel risk değerlendirmesidir (Filazi ve Şimşek, 2022). NP'lerin çevresel risk değerlendirmeleri çoğunlukla tüm risk faktörlerini dikkate almayan standart laboratuvar koşulları altında gerçekleştirilmektedir. Ancak NP'ler kaçınılmaz olarak çevrede karmaşık ortamlara maruz kalmaktadır. NP'lere dayalı güvenli ürünlerin tasarımı için fizikokimyasal özellikleri ile toksisite arasındaki ilişkinin temelden anlaşılması önemlidir (Du ve ark., 2020).

SONUÇ

Doğal yoldan oluşan NP'ler az oluştukları için çevre ve sucul canlılar için bir tehdit oluşturmamaktadır. Ancak NT'nin günden güne önem kazanmasıyla NP çeşitlerinin ve üretimin artmasıyla üretim esnasında veya sonrasında atık olarak çevreye salınması ve standart atık su arıtımında NP'ler için bir arıtma olmaması nedeniyle sucul ortama geçmektedirler. Nanometre boyutunda oldukları için canlıların vücuduna ve hücrelere kolaylıkla geçebilmektedirler. Gıda zincirindeki canlılara geçme olasılığı nedeniyle insanlar içinde bir risk faktörü olmaktadır. Bu nedenle üretimi ve atık olarak bertarafı denetlenmeli ve belirli kurallara bağlanmalıdır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin derlenmesi, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: İŞ, ÖK; **Gereç, yöntem ve veri toplama:** İŞ, ÖK; **Veri analizi ve yorum:** İŞ, AF; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** İŞ, AF.

KAYNAKLAR

- Ameen, F., Alsamhary, K., Alabdullatif, J. A. & Alnadhari, S. (2021). A Review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112027. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112027>.
- Andaç, M., Dikbaş, Ç. & Akyüz, G. (2022). Nanopartiküllerin genel özellikleri, sentez ve karakterizasyon teknikleri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences- Pharmacology and Toxicology - Special Topics*, 1-10.
- Ateş, M., Demir, V., Adıgüzel, R. & Arslan, Z. (2013). Bioaccumulation, subacute toxicity, and tissue distribution of engineered titanium dioxide nanoparticles in goldfish (*carassius auratus*). *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials*, Article ID 460518, 6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/460518>.

- Bakshi, M., Singh, H. B. & Abhilash, P. C. (2014). The unseen impact of nanoparticles: more or less?. *Current Science*, 106, 3.
- Chen, L., Hu, P., Zhang, L., Huang, S., Lou, L. & Huang, C. Z. (2012). Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Science China Chemistry* October, 55(10). <https://doi.org/10.1007/s11426-012-4620-z>.
- Chen, R., Hu, B., Liu, Y., Xu, J., Yang, G., Xu, D., et al. (2016). Beyond pm2.5: the role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1860(12):2844-2855.
- Daniel, M. C. & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size related properties, and applications toward biology, Catalysis, And Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293–346.
- Długosz, O., Sochocka, M., Ochnik, M. & Banach, M. (2021). Metal and bimetallic nanoparticles: flow synthesis, bioactivity and toxicity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 586, 807-818. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.11.005>.
- Du, J., Tang, J., Xu, S., Ge, J., Dong, Y., Li, H., et al. (2020). ZnO nanoparticles: recent advances in ecotoxicity and risk assessment. *Drug and Chemical Toxicology*, 43:3, 322-333. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1508218>.
- Filazi, A. & Şimşek, İ. (2022). Nanomateryallerin istenmeyen etkileri ve toksikolojik değerlendirme yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences- Pharmacology and Toxicology - Special Topics*, 71-77.
- Griffin, S., Masood, M. I., Nasim, M. J., Sarfraz, M., Ebokaiwe, A. P., Schäfer, K-H., et al. (2018). Natural nanoparticles: a particular matter inspired by nature. *Antioxidants*, 7, 3. <https://doi.org/10.3390/antiox7010003>.
- Haghighat, F., Kim, Y., Sourinejad, I., Yu, I. J. & Johari, S. A. (2021). Titanium dioxide nanoparticles affect the toxicity of silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 262, 127805. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127805>.
- Imani, M., Halimi, M. & Khara, H. (2015). Effects of silver nanoparticles (AgNPs) on hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Clinical Pathology*, 24:491-495. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1927-5>.
- Jovanovic, B., Ji, T. & Palic, D. (2011). Gene expression of zebrafish embryos exposed to titaniumdioxide nanoparticles and hydroxylated fullerenes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74,1518-1525.
- Kachenton, S., Jiraungkoorskul, W., Kangwanransan, N. & Tansatit, T. (2019). Cytotoxicity and histopathological analysis of titanium nanoparticles via *Artemia salina*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:14706-14711. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1856-y>.
- Krysanov, E. Y., Pavlov, D. S., Demidova, T. B. & Dgebuadze, Y. Y. (2010). Effect of nanoparticles on aquatic organisms. *Biology Bulletin*, 37,4: 406-412.
- Lopez-Serrano, A., Olivas, R. M., Landaluze, J. S. & Camara, C. (2014). Nanoparticles: a global vision. characterization, separation, and quantification methods. potential environmental and health impact. *Analytical Methods*, 6, 38-56.
- Ma, Z., Yin, X., Ji, X., Yue, J. Q., Zhang, L., Qin, J. J., et al. (2016). Evaluation and removal of emerging nanoparticle contaminants in water treatment: a review. *Desalin Water Treatment*, 57, 11221-11232. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1038734>.
- Malakar, A., Kanel, S. R., Ray, C., Snow, D. D. & Nadagouda, M. N. (2021). Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: a review. *Science of the Total Environment*, 759, 143470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>.
- Overbeck, S., Rink, L. & Haase, H. (2008). Modulating the immune response by oral zinc supplementation: a single approach for multiple diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 56, 15-30. <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0003-8>.
- Paital, B., Guru, D., Mohapatra, P., Panda, B., Parida, N., Rath, S., et al. (2019). Ecotoxic impact assessment of graphene oxide on lipid peroxidation at mitochondrial level and redox modulation in fresh water fish *Anabas testudineus*. *Chemosphere*, 224, 796-804. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.156>.
- Ruttikay-Nedecky, B., Skalickova, S., Kepinska, M., Cihalova, K., Docekalova, M., Stankova, M., et al. (2018). Development of new silver nanoparticles suitable for materials with antimicrobial properties. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15867>.
- Shaw, B. J. & Handy, R. D. (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International*, 37, 1083-1097.
- Taghavi, S. M., Momenpour, M., Azarian, M., Ahmadian, M., Souri, F., Taghavi, S. A., et al. (2013). Effects of nanoparticles on the environment and outdoor workplaces. *Electronic physician*, 5,4.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X. & Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of The Total Environment*, 409, 1444-1452.
- Yalsuyi, A. M. & Vajargah, M. F. (2017). Acute toxicity of silver nanoparticles in roach (*Rutilus rutilus*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Environmental Treatment Techniques*, Volume 5, Issue 1, Pages: 1-4.
- Zhao, C-M. & Wang, W-X. (2010). Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30,4, 885-892. <https://doi.org/10.1002/etc.451>.



DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg

Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J

ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238

Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1150298>



Tanenler: Silajlarda ve Hayvan Besleme Uygulamalarında Kullanımı

Oğuz Koray BACAŞIZ¹, Mehmet Ali AZMAN¹

¹ Balıkesir Üniversitesi, Savaştepe Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı

² Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 28.07.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 29.09.2022

ÖZ

Amaç: Bu derleme günümüz hayvancılığında yaygın olarak kullanılan silajların bozulmasını önlemek için kullanılan katkı maddelerine farklı bir alternatif olarak tanen kullanımının fermentasyon kalitesi ve hayvan besleme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Tanenler, polifenolik bileşikler olup mazı, meşe, kestane, kolza, bakla ve sorgum gibi yemlerde bulunabilen karakteristik koku, buruk tadı, sarıdan beyaza farklı renklerde doğal bileşiklerdir. Milattan önce 1500 yılından günümüze tıptan gıdaya kadar çeşitli alanlarda kullanılmışlardır. Antidiyaretik, antiseptik, antihelmintik etkileri dışında en bilinen özelliği proteinlerle bileşik oluşturmasıdır. Silolanacak yemin protein/su oranının yüksek olması silolamayı zorlaştırmakta ve fermentasyonu olumsuz etkilemektedir. Yüksek protein, proteolizis nedeniyle silajlarda laktik asit oluşumunu azaltacak ve istenilen pH değerine ulaşılamayacaktır. Tanenlerin proteinler ile bileşik oluşturarak silajlarda proteolizisi önleyebileceği ve proteinlere by-pass özellik kazandırabileceği düşünülmektedir. Böylelikle rumeni geçen proteinler ince bağırsakta sindirilerek yararlanımı artacaktır. Ayrıca ruminantların ürettiği metan gazı canlıların brüt enerjiden kayıp oluşturmakta ve sera gazıyla küresel ısınmaya katkıda bulunmaktadır. Tanenler, metan gazının azaltılması ve atılan amonyağın bertaraf edilmesinde kullanılabilecek bir alternatif olarak düşünülmektedir. **Sonuç:** Silajlarda tanen kullanımı, özellikle yüksek proteinli yemlerin silolanmasını kolaylaştırabilir, kalitesini artırabilir hayvanların besin madde ihtiyaçları daha iyi karşılanabilir. Kaba yemlerin saklama koşullarını iyileştirebilir. Tanen içeren yemleri tüketen hayvanların metan üretimi azaltılarak yenilikçi bir beslenme yöntemi sağlanabilir. Amonyağın bertaraf edilmesinde doğal bir yaklaşım olabilir. **Anahtar Kelimeler:** Tanen, Silaj, Proteolizis, Hayvan Besleme.

The Usage of Tannins to Silages and Animal Nutrition Practices

ABSTRACT

Objective: This review was made to determine the effects of using tannin on the fermentation quality and animal nutrition as a different alternative to the additives used to prevent the spoilage of silages, which are widely used in today's livestock. Tannins are polyphenolic compounds and are natural compounds with a characteristic odor, acrid taste, and different colors from yellow to white, which can be found in feeds such as gallnut, oak, chestnut, rapeseed, broad bean and sorghum. They have been used in various fields from medicine to food since 1500 BC. Apart from its antidiarrheal, antiseptic and anthelmintic effects, its most well-known feature is that it forms compounds with proteins. The high protein/water presence of the feed to be ensiled makes ensiling difficult and affects fermentation negatively. High protein will reduce lactic acid formation in silages due to proteolysis and the desired pH value will not be reached. It is thought that tannins can form compounds with proteins and prevent proteolysis in silages and provide by-pass properties to proteins. Thus, the proteins that pass through the rumen will be digested in the small intestine and their utilization will increase. In addition, methane gas produced by ruminants causes loss of gross energy and contributes to global warming with greenhouse gas. Tannins are considered as an alternative to reduce methane gas and dispose of waste ammonia. **Conclusion:** The use of tannin in silages can facilitate the ensiling of high protein feeds, increase their quality, and meet the nutrient needs of animals better. It can improve the storage conditions of roughage. An innovative feeding method can be provided by reducing the methane production of animals that consume tannin-containing feeds. It can be a natural approach to the disposal of ammonia.

Keywords: Tannin, Silage, Proteolysis, Animal Nutrition.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Oğuz Koray BACAŞIZ, Balıkesir Üniversitesi, Savaştepe Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, Balıkesir, Türkiye.

E-mail: koray.bacaksiz@balikesir.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Bacaksız, O. K., & Azman, M. A. (2022). Tanenler: silajlarda ve hayvan besleme uygulamalarında kullanımı. *BAUN Sağ Bil Derg*, 11(Supplement 1): 64-73.

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1150298>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

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

GİRİŞ

İnsanoğlu, varoluşunun ilk zamanlarından beri yaşadığı çevrenin çeşitli bitki, kabuk ve köklerini kullanarak farklı ilaçlar üretmiştir. Elde ettikleri doğal bileşikleri farklı alanlarda kullanarak türetmiş ve günümüze kadar geliştirerek ulaşmalarını sağlamışlardır. Bunların arasından bazı organik bileşikler av hayvanlarının derilerini şekillendirmek ve tabaklama işlemi için kullanmışlardır. Zamanla bu bileşiklerin hayvan yağları ve beyin gibi kısımlarının da korunarak saklanması kolaylaştırdığını keşfetmişlerdir. İlk yaygın kullanım alanlarından dolayı bu doğal kökenli polifenoller anlamı 'Tabaklama Bileşiği' olan Fransızca 'Tanin', olarak adlandırılmış, Türkçeye de 'Tanen' olarak geçmiştir (Khanbabaee ve van Ree, 2001).

Tanenler doğal olarak kestane, meşe, divi-divi, quebracho gibi ağaçlarda, sumak gibi bitkilerde ve daha birçok bitkinin kök, yaprak ve yumrularında değişik konsantrasyonlarda bulunur. Tanenler bitkinin kendini enfeksiyonlara, haşerelere ve otoburlara karşı biyolojik bir koruma yöntemi olduğu bilinmektedir (Haslam ve Cai, 1994). Kendine has bir kokusu, buruk bir tadı olan, sarıdan beyaza farklı renklerde elde edilebilen doğal bir bileşiktir (Khanbabaee ve van Ree, 2001). Tanenler, çemen otu, korunga, baklagiller, sorgum gibi kaba yem olarak kullanılabilir birçok yem bitkisinde de bulunmaktadır (Akbyay ve ark., 2020; Huang ve ark., 2022).

Milattan önce 1500 yılından beri deri endüstrisinden gıda ve ilaç sektörüne kadar birçok alanda kullanılmakta olan tanenler, özellikle Çin ve Japon tıbbında büyük bir yer tutmaktadır. İshal olgularında büzücü, ağır metal zehirlenmelerinde çöktürücü olarak, anti inflamatuvar, antiseptik ve hemostatik etkilerinden dolayı gastrointestinal tümörlerin tedavisinde sıklıkla başvurulan farmakolojik bir ajandır (Yoshida ve ark., 1991; Haslam ve Cai, 1994; Khanbabaee ve van Ree, 2001). Yüksek antioksidan özellikleri sayesinde kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve osteoporoz gibi oksidatif strese bağlı hastalıkların tedavi ve önlenmesinde kullanılmaktadır (Szcurek, 2021).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar geleneksel Çin tıbbında kullanılan bazı tanen türlerinin anti-inflamatuvar, anti-fibrotik, anti-mikrobiyal, anti diyabetik özelliklerinden dolayı akciğer kanseri türlerinde kullanılabilirliğini savunmaktadır (Rajasekar ve ark., 2021). Özellikle yeşil çay tanenleri, kakao likörü, üzüm çekirdeği, kızılıçık, sorgum kepeği, kabuk tarçın, nar yaprağı, Hint böğürtleni ve Çin mazısının akciğerde kanser önleyici etkileri olduğunu bildirilmiştir. Sonuçlar, tanenlerin apoptozu, çoğalmayı, metastazı ve anjiyogenezi kontrol eden birçok sinyal yolunu ve gen ifadesini hedefleyerek etki ettiğini göstermektedir. Deneysel akciğer kanseri tedavilerinde kullanılan tanenler iyi potansiyellerine rağmen, gastrointestinal absorpsiyonun zayıflığı, biyotransformasyon alanının

genişliği, idrar ve dışkıya hızla atılması ve yüksek tanen alımının olası olumsuz etkileri nedeniyle klinik kullanımları sınırlıdır. İlerleyen zamanda tanen etkinliğini artırılması için adjuvantların geliştirilmesi ve etkinliklerinin artırılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Rajasekar ve ark., 2021; Rajasekar ve ark., 2021).

Türkiye'de yabancı olarak 20 kadar mazı meşesi türü bulunmaktadır. Bu mazı türlerinin tanen içeriği %50-70 oranında değişmektedir. Tanenler tedavide antidiyaretik, antiseptik ve nadiren hemostatik olarak kullanılmasının yanı sıra, boya endüstrisinde ve derilerin tabaklanmasında da kullanılırlar. Batı Anadolu'da yetişen bazı meşe (Quercus) türlerinin dalları üzerinde meydana gelen pamuk mazısı %22, meşe kabukları da %10-20 oranında gallik asit taneni içermektedir. Bakır, kurşun tuzları ve alkaloidlerle zehirlenmelerde, hastaya meşe kabuğu veya mazı ile hazırlanmış infüzyonların içirilmesinin tanenlerin bu maddeleri bağlayıcı ve emilimlerini önleyici etkileri olduğu belirtilmiştir. Meşe türünün meyveleri olan palamutlar yaklaşık %10 oranında gallik asit taneni içerir. Pelit ismi de verilen palamutlardan hazırlanan %5-10'luk konsantrasyonlar peklik yapıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Türkiye'de bulunan 25 kadar söğüt ağacı türünün kabuklarının kurutulması ile %15 konsantrasyonunda tanen elde edilebilmektedir (Aydın ve Üstün, 2007).

Birkaç büyük alt sınıfı olan tanenler içerisinde kondanse tanenler, çoğunlukla bitkilerin yaprak ve gövde kısmında bulunmakla birlikte beyaz yonca ve kırmızı yonca gibi bazı yem bitkilerinin sadece çiçeğin taç yapraklarında bulunur. Hidrolize olabilir tanen konsantrasyonu yem bitkilerinde daha düşüktür. Daha yüksek miktarlarda, tropikal bölgelerdeki ağaç yapraklarında ve çalı türü bitkilerde bulunur. Tannik asit, hidrolize olabilen tanenler sınıfına ait gallotanenlerden biridir. Çay, kakao, fasulye, üzüm ve çilek gibi birçok meyve ve sebze de çokça bulunmaktadır. Tannik asit aynı zamanda genel olarak güvenli olduğu kabul edilen gıda katkı maddesi adıyla (GRAS; Generally Recognized as Safe) sınıflandırılmaktadır (Akiyama ve ark., 2001).

Bitkilerin içerdikleri tanenler etkin konsantrasyonlarda sindirim kanalı parazitleri üzerine direkt etkilerini larval gelişimi engelleyerek indirekt etkilerini ise rumende proteinlere bağlanarak ve mikrobiyal yıkılmayı engelleyerek gerçekleştirmektedir. Tanen ihtiva eden yemlerle yapılan besleme konak immünesini, parazitlerinin sayısının azaltarak geliştirebileceği, bu nedenle hayvanların performansında artış göstereceği düşündürmektedir (Min ve Hart, 2003). Tanen içeren yemlerin hayvanlarda nematodların yaşam siklusunu kırabilecekleri, otlakların enfektif larvalarla kontaminasyonunu azaltabilecekleri, dolayısıyla ruminantlar için iç parazit kontrolünde antihelmintik ilaç kullanım sıklığını azaltabileceği varsayılmaktadır (Min ve ark., 2003).

Bu derlemede tanenlerin geçmişten günümüze hayatımızda hangi şartlarda bulunduğunu, tanenlerin sınıflandırılma çalışmaları vurgulanmıştır. Ayrıca ülkemiz hayvancılığında kaba yemin silolanma koşullarının iyileştirilmesinde doğal bir koruyucu madde olan tanenin kullanımı ve faydaları değerlendirilmiştir.

GENİŞLEME

Tanenler

Günümüzde çeşitli tanen bileşikleri izole edilerek sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Griffiths, tanenlerin 1000 D ile 20000 D'ye kadar değişen farklı molar kütlelerde bulunan 'makromoleküler fenolik bileşikler' olarak tanımlamış, hidrolize olabilen ve kondanse (yoğunlaştırılmış) tanenler olarak iki grupta sınıflandırmıştır (D'Mello ve ark., 1991). Fakat bu tanımlama moleküler ağırlığı 1000 D'nin altında bulunan monomerik tanenleri kapsamadığı için kısmen eksik bir gruplandırma olarak düşünülmektedir. Fenolik bileşikler sınıfına dahil olan tanenler 500 ile 20000 D aralığında bir molekül ağırlığına sahiptirler (Aydın ve Üstün, 2007).

Yapı itibarı ile tanenler, farklı karbonhidrat türleri ve canlı hücreleri gibi makromoleküller ile kompleks yapılar oluşturmasına olanak sağlayan hidroksil grupları taşıyan aromatik halkalar içermektedirler. Bu kimyasal aktivite protein tabiatındaki yapılar ile bileşikler oluşturarak çökeltmesini sağlamaktadır (Szcurek, 2021).

Fenolik bitki materyalleri içinde ligninlerden sonra en fazla bulunan ikinci gruptur. Çok sayıda fenolik hidroksil grubu içermeleri, esas olarak proteinlerle daha az ölçüde de selüloz ve pektin gibi diğer makro moleküllerle büyük kompleksler oluşturmalarını sağlar (Bhat ve ark., 1998).

Tanenler birçok mikroorganizmanın büyümesini engeller, mikrobiyal yıkımlanmaya ve biyolojik bozunmaya karşı dirençlidirler. Kondanse tanenler, hidrolize olabilen tanenlere göre mikrobiyal bozunuma karşı daha dirençlidir ve çeşitli mikroorganizmalar için toksiktir. Bu nedenle tanenler çürükçül mikroorganizmanın biyolojik parçalayıcı enzimlerine karşı direnç gösterdiği için organik maddelerin bozulma hızını düşürür (Scalbert, 1991). Haslam, bu bitkisel polifenollerini biri galloil, heksahidroksi-difenoil esterleri ve bunların türevleri diğeri yoğunlaştırılmış proantosiyanidinler olmak üzere iki ana grup altında incelemiştir. Galloil ve heksahidroksidifenoil esterleri ve bunların türevlerini birkaç geniş alt kategoriye bölmüştür;

- 1) Basit esterler
- 2) Depsid metabolitleri (singalotaninler)
- 3) Heksahidroksidifenoil ve dehidroheksahidroksidifenoil esterler (syn-ellagitanninler)
 - a) d-glukozun 4 C1 konformasyonu
 - b) d-glukozun 1 C4 biçimi
 - c) d-glukozun "açık zincirli" türevleri

4) Monomerlerin oksidatif bağlanmasıyla oluşturulan dimerler ve yüksek oligomerler (Haslam ve Cai, 1994).

Tanen üzerine yapılan çalışmalar doğada yapısal olarak muazzam farklılıklar taşıdıklarını göstermektedir. Günümüze kadar bu konuda araştırma yapan bilim insanları kendi çalışmaları doğrultusunda tanenleri sınıflandırmaya çalışmışlardır. Bunun sonucunda aslında yapılacak olan sınıflandırmanın tanenlerin belirli yapısal ve kimyasal özelliklerine göre sistematik bir sınıflandırma sisteminin ileri çalışmalar için daha verimli olacağı düşünülmektedir. Pek çok tanen türünün su veya tanaz ile işleminden geçirilerek hidrolitik olarak bileşenlerine ayrışabilmesi bulgusu bu tür tanenlerin hidrolize olabilen tanenler olarak adlandırılmasına sebep olmuştur. Hidrolize edilemeyen oligomerik ve polimerik proantosiyanidinler ise kondanse(yoğunlaştırılmış) tanenler olarak sınıflandırılmıştır. Bu durum hidrolize edilebilen tanenler sınıfında hem gallotanenin hem de ellagitanenin bulunmasına neden olmuştur (Kashiwada ve ark., 1992; Khanbabaee ve van Ree, 2001).

1985 yılında monomerik ellagitaninlerin karakteristik yapısal elemanı olarak kabul edilmiş olan heksahidroksifenoil (HHDP) ve C-glikozidik kateşin birimlerini içeren tanenler tanımlanmıştır (Nishimura ve ark., 1986; Nonaka ve ark., 1985). Bu nedenle ellagitaninler sahip oldukları polioller birimi ile bir başka C-C eşleşmesi nedeniyle tamamen hidrolize olmazlar.

Tüm bu yapısal farklılıklar göz önüne alındığında tanenler, kimyasal yapılarına göre 4 ana grupta sınıflandırılabilir.

1. Gallotanenler: Galloil birimlerinin veya bunların meta-depsidik türevlerinin çeşitli polioller, kateşin veya triterpenoid birimlerine bağlı olduğu tüm tanenlerdir.
2. Ellagitaninler: En az iki galloil biriminin birbirine C-C bağlı olduğu ve glikozidik olarak bağlı bir kateşin birimi içermeyen tanenlerdir.
3. Kompleks tanenler: Bir kateşin biriminin bir gallotanin veya bir ellagitanin birimine glikozidik olarak bağlandığı tanenlerdir.
4. Kondanse-yoğunlaştırılmış tanenler: Bir kateşinin C-4'ünün sonraki monomerik kateşinin C-8 veya C-6'sı ile bağlanmasıyla oluşturulan oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlerdir (Khanbabaee ve van Ree, 2001).

Silajlar ve hayvan beslemede kullanımı

Kâr amacı taşıyan herhangi bir hayvancılık işletmesinin en önemli gideri yem gideridir. Özellikle ruminant beslemede dengeli ve ekonomik olarak hazırlanan rasyon, işletmenin karlılığını doğrudan etkilemektedir. Toplam giderler içerisinde yem giderleri kimi durumlarda %70-90 düzeyinde olabilmektedir. Karlılığın artırılması için yem giderlerinin düşürülmesi gerekmektedir. Özellikle

kaba yemin fazla, kaliteli ve ucuz olduğu durumlarda ruminantları sadece kaba yem ile beslemek mümkün olabilmektedir (Yaylak ve Kaya, 2001). Hayvancılığın temel felsefesi insanlar tarafından doğrudan değerlendirilemeyen sap, kavuz, çalı gibi kaba yem kaynaklarını kullanarak hayvansal ürün üretmektir. Organik hayvancılık fikrinin çıkış noktalarından birisi de bu temel üzerine kurulmuştur (Tölu ve ark., 2020).

Kaba yem ağırlıklı besleme modellerinin geliştirilmesinin bir diğer ana sebebi kesif yemde kullanılan protein kaynakları ile birçok yem ham maddesi ve yem katkı maddelerinin deniz aşırı ülkelerden ithal edilmesidir. Döviz kurlarına bağlı olarak kesif yemin birim fiyatını arttırmakta, dolayısıyla hayvancılıktaki karlılığı azaltmaktadır.

Türkiye’de kaba yem üretiminin yetersizliği ve kalitesinin düşük olması konsantre yemlere olan ihtiyacı arttırmakta, bu durum da üretim maliyetlerinin yükselmesine yol açmaktadır. Ülkemizin bazı bölgelerinin kurak iklime sahip olması, bölgelerin aldığı yağış rejimindeki düzensizlikler, mera yönetim problemleri, aşırı otlatma, meraların orta ve düşük kaliteden ileriye gidememesine neden olmaktadır.

Tüm bunlar ele alındığında sınırlı zaman aralığında sınırlı bölgelerden elde edilen kaliteli kaba yemin yılın her zamanında ulaşılabilir olması için çeşitli konserve yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun bir yolu yemlerin silolanmasıdır. Diğer yandan silaj materyali olarak kullanılarak hem yemin besin madde değerlerinin yükseltilmesi, hem de probiyotik özellik kazandırılması mümkündür. Yemlerin silolanması, yemi olumsuz hava koşullarından korumak, mevsim dışında da tüketimini sağlamak, hasat sonrasında kurutmaya nazaran daha az besin madde kaybı görülmesi gibi nedenlerle çokça tercih edilen bir uygulamadır (Bolsen ve ark., 1996; Coblent ve Akins, 2018).

Silolama işlemi, yem materyalinin su ve protein miktarının fazlalığı gibi nedenlerden dolayı zorlaşmaktadır. Bu durum düzgün bir fermentasyon gelişimini engellemektedir. Özellikle protein, mikroorganizmalar tarafından parçalanarak (proteolizis) pH düşüşünü engeller ve laktik asit üretimini düşürür (Jayanegara ve ark., 2019).

Proteinlerin yıkımlanması, bitki ve bitki ile birlikte gelen mikroorganizmaların enzimleri etkisi ile proteaz ve peptidaz aktivitelelerinden kaynaklanmaktadır (Carpintero ve ark., 1979). Bitki proteinini çoğunlukla protein tabiatında olmayan azotlu bileşiklere (NPN) dönüştürür. Bu durum, yem tüketimini olumsuz etkilerken, tüketilen kaba yemde fazla miktar azot bulunmasına neden olur (Huhtanen ve ark., 2008). Silajın protein içeriğinin parçalanarak amonyak serbestleşmesi sonucunda rumen mikroflorası olumsuz etkilenir, fazla amonyak daha fazla üre şeklinde idrar ile atılarak çevre kirliliğini artırır (Dijkstra ve ark., 2013).

Silolama sırasında oluşan proteolizis ile birlikte salınan amonyum fermentasyon yoluyla gelişmesi

gereken pH düşüşünü engeller, silajın tamponlama kapasitesi artar, yeterli pH düşüşü sağlanamaz (Ohshima ve McDonald, 1978). Bu nedenle kaba yemleri silolama sırasında protein hidrolizinden korumak için ekonomik ve etkili uygulamalara ihtiyaç duyulmakta, bu uygulamalarla by-pass protein seviyesinin de artırması beklenmektedir (Rinne ve ark., 2009).

Tanenler, birçok bitkide proteini bozulmaya karşı koruyan bir grup doğal maddedir (Mueller-Harvey, 2006). Tanenler ile proteinler arasındaki bu etkileşim, tanenlerle proteinlerin arasında bağların kurulmasını kolaylaştıran çoklu fenolik hidroksil gruplarının varlığıyla açıklanmaktadır. Bu bağların yapısı, bitkinin doğal yapısı, moleküler ağırlığı, izoelektrik noktası, tersiyer yapılar ve bağlanma noktalarının uyumluluğu açısından farklılıklar göstermektedir (Reed, 1995). Bu veriler tanenin rumende proteinlerin yıkımını engelleyici bir koruma oluşturacağını düşündürmektedir (Waghorn ve ark., 1987; Yuxi Wang ve ark., 1994). Tanenler farklı kimyevi özellikler ve konsantrasyonlarda proteinleri bağlayarak rumenden bozulmadan geçmesini sağlar. Fakat bu durum ince bağırsakta sindirim ve emilime engel olmamaktadır (Yuxi Wang ve ark., 1994). Bu nedenle tanenler silajların protein içeriğinin korunması için potansiyel bir katkı maddesi olarak düşünülmelidir.

Tanenlerin, ruminantlarda rasyon proteininin rumende meydana getireceği bozulmaya karşı koruyucu etki gösterdiği ve ince bağırsakta amino asit emilimini arttırdığı bildirilmiştir (Barry ve McNabb, 1999).

Fakat belirli yoğunluğun üstünde kullanılan tanenler lif ve protein sindirimini olumsuz etkilemektedir. Bu durum tanenlerin farklı yoğunluklarda tripsin ve alfa amilaza olan etkileri ile açıklanmaktadır. Tanenler orta yoğunlukta (Kuru maddenin (KM) %2-4,5) kullanıldığında olumlu etkiler gösterebilirken yüksek yoğunlukta (KM’nin %5 ve üzeri) kullanıldığında yem alımını ve verim özelliklerini düşürebilmektedir. Bununla birlikte etkileri de tanenlerin farklı kimyasal yapıları nedeniyle değişkenlik gösterebilmektedir (Hervás ve ark., 2003; B. R. Min ve ark., 2002).

Hidrolize tanenler kimyasal yapı itibarı ile merkezinde karbonhidrat (genellikle D-glukoz) ve fenolik gruplarla esterleşmiş hidroksil grupları barındırırlar. Zayıf asitler, zayıf bazlar, sıcak su veya tannaz gibi enzimler ile bağlarından kopararak hidrolize olabilirler. Sonuç olarak karbonhidrat ve fenolik asite ayrışırlar. Hidrolize tanenler bitkilerde genellikle meyve tohumlarında bulunurlar, fakat konsantrasyon itibarı ile düşük seviyededirler. Ruminantlar sahip oldukları ruminal mikrofloranın enzimatik işlevleriyle ve gastrik sindirimle tanenleri yıkımlayarak daha düşük molekül ağırlıklı, emilebilir toksik metabolitlere ayrıştırırlar. Yıkımlanma sonucu gallik asit, pirogallol, floriglusinol oluşur. Bu metabolitler ruminal mikroorganizmalar tarafından asetat ve bütirata dönüştürülürler. Çok fazla miktarda

çözünme metabolit miktarını artırır ve zehirlenme vakaları görülebilir. Doğal olarak zehirlenme genellikle hidrolize olabilir tanenlerden kaynaklanmaktadır (Bhat ve ark., 1998; Goel ve ark., 2005).

Hidrolize tanenler, kondanse tanenler ile karşılaştırıldığında hayvan performansı üzerindeki olumsuz etkileri olduğu düşünüldüğünden silajlarda yaygın olarak kullanılmamaktaydı (Beauchemin ve ark., 2008). Fakat bu etkiler; tanenin çeşidine, konsantrasyonuna, hayvanın türüne, hayvanın fizyolojik durumuna, yaşına, rasyonun içeriğine bağlı olarak değiştiği ifade edilmiştir (Kamalak, 2007).

Bununla birlikte yapılan son çalışmalar, hidrolize tanenlerin hayvan performansını üzerinde çeşitli etkiler olmaksızın azot kullanımını da artırabileceğini göstermiştir (Ke ve ark., 2022).

Tanenlerin, pH'nın 3.5-7.5 aralığında olduğu ortamlarda proteinler ile kompleks oluşturdukları ve bu şekilde proteinlerin rumendeki mikrobiyal sindirimini azalttığı belirtilmiştir. Bu durum rumende amonyak oluşumunu azaltır ve by-pass protein miktarını artırır. Abomasum pH'sı 2.5-3.5 arasında değişmektedir. Bu pH aralığında tanen-protein bileşikleri çözülmekte, proteinler ince bağırsakta sindirilerek emilmektedir. Öte yandan tanenlerin abomasumda çözünmesi ince bağırsaktaki (pH 7.5-8.5) enzim ve proteinler üzerinde olumsuz etkiye neden olabileceği düşünülmektedir (Silanikove ve ark., 1994).

Salawu ve arkadaşları (1999) ryegrass silajı ile yaptıkları iki farklı çalışmada, ilk denemede ryegrass hasılı ağustos ayında hasat edilerek -20°C'de 2 hafta saklanmıştır. Çalışmada mimoza, kiraz ve quebracho bitkilerinden elde edilen tanenler 5 ve 50 g/kg/KM dozlarında 20 ml/kg distile su içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır. Silolama işlemi 500 gramlık torbalar içerisine 200 g/kg KM hesabına göre 5 ve 50 g/kg/KM tanen için 0.5 ve 5 gr tanen olacak şekilde 10 ml distile su ile sulandırarak uygulanmıştır. Üç farklı tanenin 2 farklı dozu ve bir kontrol olmak üzere toplam 7 grup 4'er tekrardan oluşan bir deneme düzeni kurulmuştur. Hazırlanan silajlar 7 ve 32. günlerde açılmıştır. İkinci deneme de ise yem materyali olan ryegrass hasılı 1996'nın haziran ayında hasat edilerek -20°C'de 2 hafta saklanmış, silolama işleminden önce çıkarılarak bir gece çözdürülmüştür. Bu denemede quebracho ve mimoza tanenleri ile formaldehit ve formik asit ile muamele edilen gruplar oluşturulmuştur. Deneme düzeninde tanen 50 g/kg/KM, formaldehit ve formik asit 12.5 g/kg/KM dozlarında ilave edilmiştir. Biri kontrol 7'si muamele grubu 3'er tekrar olacak şekilde 49 gün birinci denemede olduğu şekilde fermente edilmiştir. Her gruptan 7, 14, 49. günlerde 3'er örnek açılarak analizlere tabi tutulmuştur. Ayrıca silaj denemeleri Frizyan süt ineklerinde kese yöntemi ile sindirim denemesine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak ilk deneme düzeninde hazırlanan silajların fermantasyon kalitesi kötü olarak bulunmuş, fakat

ikinci silaj denemesinde tanen kullanılan silajlarda serbest amonyak azotunda azalma meydana gelmiştir. Bu durumun tanenlerin proteolizisi engellemesinden dolayı geliştiğini belirtmişlerdir. Sindirim denemesine tabi tutulan silaj örneklerinde ise tanenlerin protein korunumunda formaldehit kadar iyi olmadığını, silaj fermantasyon kalitesinin artırılmasında da formik asitten daha iyi olmadığı vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra tanenlerin rumen protein yıkımını azalttığı fakat bağırsaktaki sindirimi etkilemediğini tespit etmişlerdir. Formaldehit ve formik asit gibi kimyasalların mevcut tehlikelerinin tanen gibi doğal bileşiklerde bulunmaması, tanenlerin farklı çeşit varyasyonlarda farklı dozlarda farklı etkilerinin olabileceği ve bu potansiyel etkilerin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir (Salawu ve ark., 1999).

Hervas ve arkadaşları (2003) rumen fistülü takılmış 16 baş merinos koyunda canlı ağırlıklarına göre 0.5, 1.5, 3.0 g/kg oranlarında quebracho özütü kullanarak yaptıkları bir çalışmada, her birinde 4 baş koyun bulunan biri kontrol 3'ü deneme olmak üzere toplam 4 grup oluşturulmuş, koyunlar bazal bir diyet ile 21 gün süreyle beslenmiş, her yemlemeyi takiben günde iki defa olmak üzere fistül içinden tanen uygulaması yapılmıştır. Hayvanlara 3.0 g/kg/Canlı Ağırlık (CA) düzeyinde tanen uygulanan grupta deneyin 10. gününde tanenin toksik olduğu fark edilmiş ve hayvanlar ötenazi edilerek uyutulmuştur. Uyutulan hayvanların rumen hareketleri denemenin 9. gününde tamamen durmuş olarak kayıt altına alınmıştır. İn vitro gaz üretim tekniği ve in situ torba analizlerinin sonuçları quebracho tanenlerinin rumen üzerine olan etkilerinin doza bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Günde 0.5 g/kg/CA dozunda kullanılan tanen, rumen üzerine herhangi bir olumsuz etki yapmazken 1.5 g/kg/CA dozunda in situ sindirim analizi ve in vitro gaz tekniği verilerini olumsuz olarak etkilediğini belirtmişlerdir (Hervás ve ark., 2003).

Tabacco ve arkadaşları (2006) iki farklı yonca silajına kestane hidrolize tanenini katarak yaptıkları çalışmada, birinci deneme laboratuvar ortamında silolan yonca silajına katılan tanenin silaj fermantasyon kalitesi ve rumen protein yıkımını, ikinci deneme ise tarla şartlarında balya yapılan yonca silajında kullanılan tanenin silaj fermantasyon kalitesi ve proteoliz üzerine etkisini denemişlerdir. İlk deneme laboratuvar ortamında 5 litrelik cam kavanozlara silolanmış ve herhangi bir katkı yapılmamış olan kontrol grubu; silaj kuru maddesine %2, 4 ve 6 oranında tanen katılan 3 grup ile fermantasyon 120 gün sürdürülmüştür. Kavanozlar sadece gaz salınımına izin verecek plastik bir kapak ile kapatılmış, 120 günlük muhafaza sırasında 1, 4, 7, 14, 20, 27, 48, 70 ve 120. günlerde tartılarak fermantasyon kayıpları tespit edilmiştir. İkinci deneme biçilen yoncanın tarlada 5 ve 28 saat soldurulması sonucu %40 ve 50 kuru madde oranının elde edilmesi ile yapılmıştır. Bu denemede tanen balyalara kuru maddenin %4'ü kadar katılarak

uygulanmıştır. İkinci denemede yapılan 16 balya, 78 gün muhafaza edilip besin madde analizleri yapılmıştır. Daha sonra rumen fistülü açılmış 3 Holştayn Frizyan inekte in situ yöntemi ile rumen protein yıkımının ölçülmesi, in vitro gaz testi yapılmıştır. Sonuç olarak kuru maddede %4 düzeyinde uygulanan tanenin sindirimde bir miktar düşüşe neden olsa da silaj proteolizisini azalttığı belirtilmiştir (Tabacco ve ark., 2006).

Deaville ve arkadaşları (2010) ryegrass hasılından silaj yaptıkları çalışmada mimoza ve kestane tanenini kullanmışlardır. Tanenler yem karma makinasına silolama işlemi yapılırken 75 g/kg/KM dozunda eklenmiştir. Silaj çuvalları ağzı mühürlenerek 90 günlük fermentasyona bırakılmıştır. Çalışmanın hayvan materyali 5 grup, her grupta 8 baş olmak üzere toplam 40 baş koyundan oluşmuştur. Gruplar biri kontrol 4'ü deneme grubu olarak düzenlenmiştir. Tanenler deneme gruplarının 2'sine koyunlar yemlenirken silaja katılmış, diğer iki deneme grubuna ise yem materyali silolanırken katılmıştır. Kestane taneni katılan silajlar koyunlar tarafından kuru madde bazında daha fazla tüketilmiştir. Her iki tanen eklenen grupta da idrar azot atılımının azaldığı, dışkı azot atılımının ise arttığı ifade edilmiştir. Bu sonuçlar silajın ham protein içeriğinin rumende yıkımlanmadan by-pass olarak geçtiğini düşündürmüştü, özellikle yüksek protein ihtiyacı olan ergin hayvanlarda kullanılabileceğini ortaya koymuş; yem tüketimindeki düşüş çözülebilirse tanen kullanılan yemler antihelmintik, astrenjan etkileri ile de antidiyaretik olarak verilebileceği de ifade edilmiştir (Deaville ve ark., 2010).

Jayanegara ve arkadaşları (2015) kondanse ve hidrolize tanenlerin in vitro sindirim üzerine etkilerini tespit etmek üzere yaptıkları bir çalışmada kestane ve sumaktan elde edilen hidrolize tanenleri, mimoza ve quebracadan elde edilen kondanse tanenleri kullanmışlardır. Araştırmacılar ekstrakte ettikleri tanenleri 0.5, 0.75 ve 1.0 mg/ml dozlarında hacimce 70:30 oranında hazırlanan saman:konsantre yem karmasını substrat olarak kullandıkları in vitro sindirim denemesine tabi tutmuşlardır. Konsantre yem karmasının içeriği arpa, soya ve kolza yağından oluşmuş, substrat ve tanenler daha önce bahsedilen dozlarda 24 saat in vitro sindirim denemesine tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası metan üretimi, kısa zincirli yağ asitlerinin analizi, organik madde sindirilebilirliği ve mikrobiyal popülasyon analizleri uygulanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilerde hidrolize tanenler, kondanse tanenlere göre metan üretiminde azalmaya neden olmuştur. Analizlerde iki farklı tanen türünün BSA (Sığır Serum Albumünü) protein bağlama kapasitesi karşılaştırılmış hidrolize tanenler proteinleri daha iyi bağlayarak metan üretimini düşürdüğü vurgulanmıştır. Bu nedenle hidrolize tanenlerin kondanse tanenlere göre daha fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir (Jayanegara ve ark., 2015). Azman (2017) yonca silajına meşe palamudu katılmasının silaj

fermentasyonu ve aerobik stabilite üzerine etkisini belirlemek üzere bir çalışma yapmıştır. Laboratuvar tipi kavanozlara yoncanın kuru madde düzeyine göre %5, 10 ve 20'lik konsantrasyonlarda meşe palamudu karıştırılmış, sıkıştırılarak doldurularak ağzı hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Çalışmada biri kontrol, üçü deneme olmak üzere 4 grup bulunmaktadır. Her grup için toplam 48 kavanoz silaj hazırlanıp, oda sıcaklığında (20-28°C) fermente olmaya bırakılmıştır. Çalışma düzeni kurulduktan sonraki 4, 8, 12 ve 60. günlerde her gruptan 3'er kavanoz açılarak kimyasal ve mikrobiyolojik analizler için örnek alınmıştır. Sonuç olarak yonca silajına meşe palamudunun katılmasının silaj kuru madde düzeyini kısmen artırdığı fakat fermentasyon üzerine olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bunun sebebinin silaja katılmak üzere seçilen İran palamut meşesinin (*Quercus brantii* lindley), diğer meşe palamutlarına göre tanen içeriği daha düşük olması ve bu nedenle fermentasyon üzerine etkisiz kalmış olabileceği şeklinde belirtilmiştir (Azman, 2017).

Jayanegara ve arkadaşları (2019) birçok çalışmanın incelendiği bir meta analizde silajda tanen kullanımının bütirik asit konsantrasyonunda azalmaya neden olduğunu, buna bağlı olarak da tanenlerin klostridia üremesini kontrol altına aldığını ifade etmişlerdir. Tanenlerin bitki ve mikrobiyal proteinazları etkileyerek yem proteinleri ile bileşikler oluşturarak silaj proteolizisini önleyebileceği, ayrıca silaj pH'sında ve laktat üzerine bir değişim sağlamaması nedeniyle fermentasyona herhangi bir olumsuz katkısının olmayacağı belirtilmiştir (Jayanegara ve ark., 2019).

Beck ve arkadaşları (2019) rasyonla oluşan fazla miktardaki serbest amonyak azotunun hayvan ve çevreye olan etkilerini azaltmak için yaptıkları bir çalışmada, deniz yosunu ekstraktının farklı dozlarını ve quebracho tanenini *in vitro* sindirim düzeneğinde test etmişlerdir. Araştırmada Yeni Zelanda'ya has bir deniz yosunu ile quebracho tanenlerini serbest amonyak azotunu azaltmak için kullanmışlardır. Denemenin in vitro aşamasının inokulumu laktasyonda olmayan rumen fistüllü 4 baş Holştayn Jersey meleziinden alınmıştır. Deneme gruplarını hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubu, birer kg taze biçilmiş ryegrass otuna 0, 2, 9.5, 31.5 mikrolitre deniz yosunu ekstraktı eklenmiş gruplar ile deniz yosunu olan gruplara 4 mg ve 10 mg tanen eklenen gruplar oluşturmuştur. Tanenlerin bu kadar düşük dozda kullanılmasının nedeninin tanen etkinliğinin belirlenmeye çalışılmasından ziyade deniz yosunu ile olacak olası sinerjik etkileri belirlemek için yapıldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak düşük miktarda deniz yosununun kullanımı rumen serbest amonyak azotunu azalttığı, fakat tanenlerle beraber kullanıldığında etkisini gösteremediği ifade edilmiştir (Beck ve ark., 2019). Kaba yem olarak ülkemizde ve dünyada sıkça tercih edilen yonca kurutulmuş balya yapılmakta veya silolanarak silaj haline getirilerek

saklanmaktadır. Yonca hayvanlar tarafından sevilerek tüketilen bir bitki olup, protein oranının yüksek, selüloz oranının düşük olduğu dönem olan çiçeklenme başı hasat edilir, bu nedenle yüksek proteinli ve sulu bir yapıya sahiptir. Protein içeriği nedeniyle silolama sonrasında proteolize uğrar ve sahip olduğu proteine bağlı azotun yaklaşık %88 kadarı protein tabiatında olmayan azotlu bileşiklere (NPN) dönüşür. Bu durum silajın protein düzeyinin azalmasına neden olur (Ohshima ve McDonald, 1978; Getachew ve ark., 2006). Ke ve arkadaşları (2022) yonca silajına ayrı ayrı kondanse ve hidrolize tanenleri katarak silaj kalitesinde bakteri popülasyonuna ve protein bozulumuna olan etkilerini incelemişlerdir. Erken çiçeklenme döneminde biçilen yoncayı %35 kuru madde oluncaya kadar soldurmuşlardır. Hidrolize tanen olarak ticari bir markanın saflaştırılmış kestane taneni, kondanse tanen olarak da yine ticari bir markanın şarap endüstrisi için ürettiği saflaştırılmış üzüm taneni kullanılmıştır. İki farklı tanen türünün bakteri popülasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş hidrolize olabilen tanenlerin laktik asit bakterilerinin sayısını azalttığını enterococcus bakterilerini arttırdığını tespit edilmiştir. Kondanse tanen kullanılan muamele gruplarında ise tam tersi bir durum söz konusu olmuştur. Bakteri varlığı üzerine farklı etkiler gösterse de protein korunumu için iki tanen türünün de etkili olduğu bildirilmiştir (Ke ve ark., 2022). Yine aynı şekilde Chen ve arkadaşları (2022) yonca silajına mazı taneni ve *Lactobacillus plantarum* kullanarak yaptıkları bir çalışmada, in vitro ruminal metan üretimi ve mikrobiyota üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Yonca silajına mazı taneni ve *L. plantarum* ayrı ayrı veya birlikte katılarak deneme grupları oluşturulmuş, 60 günlük bir fermentasyona tabi tutulmuştur. Katkı yapılmış bütün gruplarda metan üretimi azalmış ve propiyonik asit miktarında ve *Fibrobacter succinogenes* sayılarında artış görüldüğü bildirilmiştir. Sadece *Lactobacillus plantarum* eklenen grupta sellobiaz, pektinaz ve proteaz aktivitelerini ve *Prevotella ruminicola* sayısında artış bulunmuştur. Mazı tanenin tek başına 50 g/kg/KM yüksek doz şeklinde kullanıldığı grupta ruminal fermentasyona inhibitör etki gösterdiği ve baskın rumen mikroorganizmalarını inhibe ettiği belirtilmiştir. Daha önemli sonuçlar bakteri ve mazı tanenin birlikte eklendiği grupta *Rumincoccus flavefaciens* ve *Prevotella ruminicola* sayısının yanı sıra pektinaz ve proteaz aktivitelerinde artış görülmüş; bu değişimlerin yüksek doz mazı taneni eklenen grupta olumsuz parametreler üzerinde düzenleyici etkileri olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar silajlara tanen ile birlikte probiyotik bakteri katılmasını önermişlerdir (Chen ve ark., 2022). Hayvan beslemenin esas amacı hayvanı en ekonomik şartlarda besleyerek en fazla verimi elde etmektir. Bunun yanı sıra doğaya karşı saygılı davranmalı ve metan emisyonu düşürülmelidir. Metan emisyonu düşürme işlemleri rasyon

manipülasyonları ile yapılabildiği gibi katkı maddeleri ile dışkınn muamele edilmesi ile de gerçekleştirilebilir.

Son yıllarda artan karbon ayak izimiz dünya iklim krizini daha da derinleştirmektedir. Sadece Avrupa kıtasının amonyak emisyonunun % 90'ı tarım endüstrisinden ve bu verinin % 41'i ise besi sığırı yetiştiriciliğinden kaynaklanmaktadır (Erisman ve ark., 2008; Paulot ve ark., 2014).

Yue Wang ve arkadaşları (2018) yaptıkları hesaplamalara göre bir besi sığırının hayvan başına yıllık sera gazı salınımının 50 kg amonyak olduğunu belirtmişlerdir (Yue Wang ve ark., 2018). Amonyak buharlaştıktan sonra atmosfere azot oksit (NOx) olarak dağılır. Azot oksit atmosferin sahip olduğu azot dengesinde dengesizlik yaratır ve küresel ısınmaya katkıda bulunur (Gronwald ve ark., 2018). Küresel ısınmaya katkıları kıyaslandığında, amonyağın CO₂'den 265 kat daha tehlikeli olduğu bildirilmiştir. Çünkü amonyak, sera gazlarının en tehlikelisi olan azot oksit habercisidir (Ravishankara ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2018). Amonyak sadece hava kirliliğinin değil, karıştığı su ekosisteminde plankton ve alg varlığının kontrolsüzce artarak kokuşma (ötrofikasyon-alg patlaması) (Bergström ve Jansson, 2006), toprakta ise asitleşmeye ve kirliliğe neden olmaktadır (Song ve ark., 2016). Avrupa Çevre Ajansı (EU-25) ve taraf ülkeler 2030 yılına kadar 2005 sera gazı üretim verilerini baz alarak tarım endüstrisi kaynaklı karbon ayak izini %30 azaltacağını taahhüt etmiştir (Sepperer ve ark., 2020). Tanenler son yıllarda artan bir taleple mobilya sektöründen, kimya sanayisine kadar çok çeşitli bir kullanım alanına sahip olmuştur. Sepperer ve arkadaşları (2020) tanen ve tanen bazlı sıvı çözeltilerinin amonyak absorpsiyonunu belirlemek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Adsorbanlar için mimoza ve kestane taneni kullanılarak kondanse ve hidrolize iki farklı tanen türü denenmiş, çalışmanın amonyak kaynağı olan dışkı özel bir işletmeden temin edilmiştir. Temin edilen malzemeler ile tanen jeli ve tanen-furanik köpük üretilmiştir. Köpük için tanen müstahzarı (%42), furfural alkol (%26), su (%8), köpürtme maddesi (%6) ve sülfürik asit katalizörü (%18, %32 yoğunluk) karıştırılmış ve sıcak preste işlenmiştir. Tanen-jel için tanen müstahzarı, seyreltilmiş sülfürik asit ile karıştırılarak 2 saat boyunca 90°C'de reaksiyona tabi tutulmuştur. Mimoza tanen bazlı adsorbanların, her iki deneyde de kestane tanenine göre kabaca %10 daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar, tanenlerin ve tanen bazlı ürünlerin amonyağı bağlamak için uygun adsorbanlar olarak kullanılabilirliğini göstermekte; karbon ayak izimizi azaltmak ve Avrupa Birliği'nin tarımsal amonyak emisyon hedeflerini gerçekleştirmek için alternatif bir yol sunmaktadır. Amonyak emisyonunun azaltılması üzerindeki uzun vadeli etkileri araştırmak ve tanen bazlı adsorbanlar ile oluşturulan komplekslerin toprak azotunun dönüşüm sürecinin daha iyi anlaşılması için ileri

düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Sepperer ve ark., 2020).

SONUÇ

Son zamanlarda dünya literatüründe ve hayvan besleme bilimi içerisinde, kalıntı bırakmayan katkı maddelerinin kullanımının önemi daha iyi anlaşılmıştır. İncelenen literatürler ışığında elde edilen çıkarımlar şunlardır;

- Hayvan besleme uygulamalarında insan gıdası olarak kullanılmayacak ürünlerin rasyonlarda kullanımları yaygınlaştırılmalı, bu ürünlerin fayda ve zararları paylaşarak bilgi havuzu oluşturulmalıdır.
- Ruminantların beslenmesinde maliyetin düşürülmesi ve kazandığı probiyotik özellikleri nedeni ile sağlığın korunmasında büyük etkileri olan silajların kalitesinin artırılmasının et, süt üretimine ve işletme karlılığına doğrudan olumlu etkiler sağlayacağı düşünülmektedir.
- Tanen bileşiklerinin silajlarda kullanımı silaj kalitesini arttırabilir. Fakat kullanılacak olan katkı maddeleri ister bitki özütleri ister tanenler, saponinler, esansiyel yağlar veya enzimler olsun yem katkı maddesi olarak kullanılmadan önce doz/yanıt değerlendirilmesi yapılmalıdır. Bu nedenle tanen bileşiklerinin silajlarda kullanımı ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılarak güvenli kullanım dozları tespit edilmelidir.
- Yemlere katılacak bütün katkı maddelerinin yüksek dozları toksik etkiler gösterebilmektedir. Bu nedenle tanen bakımından zengin yemler başta anemi ve konstipasyon olmak üzere yem tüketiminin azalması, yemden yararlanma oranında düşüş ve vitamin mineral emiliminde bozulmaya neden olacaktır.
- Son dönemde etkileri ciddi bir şekilde hissedilen küresel ısınma ve sonucunda gelişen gıda krizinin çözümünde doğal katkı maddeleri uygulamaları daha önemli bir yer edinecektir. Yeni yaklaşımlarda metan gibi sera gazlarının azaltılması ve amonyak kaynaklarının bertaraf edilmesi gibi ileri işlemlerde tanenlerin kullanılabilceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak, tanenlerin hayvan beslemede giderlerin azaltılması, silajların kalitesinin artırılması, proteolizisten korunma için kullanım potansiyelinin bulunduğu; ancak tanenlerin hayvanlar üzerindeki fayda ve zararlarının belirlenebilmesi için daha fazla araştırmanın gerekli olduğu düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Araştırmada herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: OKB, MAA; **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** OKB, MAA.

KAYNAKLAR

- Akbay, F., Erol, A., ve Kamalak, A. (2020). Farklı hasat döneminin çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) otunun kimyasal bileşimi, metan üretimi ve kondense tanen içeriği üzerine etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 3(6), 1663–1668. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.688749>
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., ve Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4), 487–491. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>
- Aydın, A., ve Üstün, F. (2007). Tanenler. Kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 21–31.
- Azman, M. A. (2017). The effect of the acorn supplementation on alfalfa siage fermentation. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 6(3), 118–131. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2017.40855>
- Barry, T. N., ve McNabb, W. C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 263–272. <https://doi.org/10.1017/s0007114599000501>
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., ve McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(1–2), 21–27. <https://doi.org/10.1071/EA07199>
- Beck, M. R., Al-Marashdeh, O., ve Gregorini, P. (2019). Low levels of a seaweed (*Ecklonia radiata*) extract alter in vitro fermentation products but not in combination with quebracho (*Schinopsis quebrachocolorado*) tannins. *Applied Animal Science*, 35(5), 476–481. <https://doi.org/10.15232/aas.2019-01892>
- Bergström, A. K., ve Jansson, M. (2006). Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biology*, 12(4), 635–643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01129.x>
- Bhat, T. K., Singh, B., ve Sharma, O. P. (1998). Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation*, 9(5), 343–357. <https://doi.org/10.1023/A:1008397506963>
- Bolsen, K., Ashbell, G., ve Weinberg, Z. (1996). Silage fermentation and silage additives. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 9(5), 483–493. <https://doi.org/https://doi.org/10.5713/ajas.1996.483>
- Carpintero, C., Henderson, A., ve McDonald, P. (1979). The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass and Forage Science*, 34(4), 311–315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1979.tb01483.x>
- Chen, L., Bao, X., Guo, G., Huo, W., Li, Q., Xu, Q., Wang, C., ve Liu, Q. (2022). Evaluation of gallnut tannin and *Lactobacillus plantarum* as natural modifiers for alfalfa silage: Ensiling characteristics, in vitro ruminal methane production, fermentation profile and microbiota. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 907–918. <https://doi.org/10.1111/jam.15246>

- Coblentz, W. K., ve Akins, M. S. (2018). Silage review: Recent advances and future technologies for baled silages. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 4075–4092. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13708>
- D’Mello, J. P. F., Duffus, C. M., ve Duffus, J. H. (1991). Toxic Substances in Crop Plants. In *Toxic Substances in Crop Plants*. <https://doi.org/10.1533/9781845698454>
- Deaville, E. R., Givens, D. I., ve Mueller-Harvey, I. (2010). Chestnut and mimosa tannin silages: Effects in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilisation and losses. *Animal Feed Science and Technology*, *157*(3–4), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.02.007>
- Dijkstra, J., Oenema, O., van Groenigen, J. W., Spek, J. W., van Vuuren, A. M., ve Bannink, A. (2013). Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, *7* Suppl 2, 292–302. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000578>
- Erisman, J. W., Bleeker, A., Hensen, A., ve Vermeulen, A. (2008). Agricultural air quality in Europe and the future perspectives. *Atmospheric Environment*, *42*(14), 3209–3217. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.04.004>
- Getachew, G., Depeters, E. J., Pittroff, W., Putnam, D. H., ve Dandekar, A. M. (2006). Does protein in alfalfa need protection from rumen microbes? *Professional Animal Scientist*, *22*(5), 364–373. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31129-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31129-3)
- Goel, G., Puniya, A. K., Aguilar, C. N., ve Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, *92*(11), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0040-7>
- Gronwald, M., Helfrich, M., Don, A., Fuß, R., Well, R., ve Flessa, H. (2018). Application of hydrochar and pyrochar to manure is not effective for mitigation of ammonia emissions from cattle slurry and poultry manure. *Biology and Fertility of Soils*, *54*(4), 451–465. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1273-x>
- Haslam, E., ve Cai, Y. (1994). Plant polyphenols (Vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Natural Product Reports*, *11*, 41–66. <https://doi.org/10.1039/NP9941100041>
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mantecón, Á. R., ve Álvarez Del Pino, M. C. (2003). Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, *109*(1–4), 65–78. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00208-6)
- Huang, R., Zhang, F., Wang, T., Zhang, Y., Li, X., Chen, Y., ve Ma, C. (2022). Effect of intrinsic tannins on the fermentation quality and associated with the bacterial and fungal community of sainfoin silage. *Microorganisms*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050844>
- Huhtanen, P., Rinne, M., ve Nousiainen, J. (2008). Effects of silage soluble nitrogen components on metabolizable protein concentration: A meta-analysis of dairy cow production experiments. *Journal of Dairy Science*, *91*(3), 1150–1158. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0323>
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P. S., ve Becker, K. (2015). Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, *209*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.002>
- Jayanegara, A., Sujarnoko, T. U. P., Ridla, M., Kondo, M., ve Kreuzer, M. (2019). Silage quality as influenced by concentration and type of tannins present in the material ensiled: A meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(2), 456–465. <https://doi.org/10.1111/jpn.13050>
- Kamalak, A. (2007). Kondense tanenin olumsuz etkilerini azaltmak için kullanılan katkı maddeleri ve yemlere uygulanan işlemler. *KSU Journal of Science and Engineering*, *10*(2), 144–150. <http://acikerisim.ksu.edu.tr:8080/xmlui/handle/ksu/271>
- Kashiwada, Y., Nonaka, G. I., Nishioka, I., Chang, J. J., ve Lee, K. H. (1992). Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *Journal of Natural Products*, *55*(8), 1033–1043. <https://doi.org/10.1021/np50086a002>
- Ke, W., Zhang, H., Li, S., Xue, Y., Wang, Y., Dong, W., Cai, Y., ve Zhang, G. (2022). Influence of condensed and hydrolysable tannins on the bacterial community, protein degradation, and fermentation quality of alfalfa silage. *Animals*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/ani12070831>
- Khanbabaee, K., ve van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*, *18*(6), 641–649. <https://doi.org/10.1039/b1010611>
- Min, B., ve Hart, S. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, *81*(14_suppl_2), E102–E109. www.asas.org/symposia/03esupp2/jas2418.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/2003.8114_suppl_2E102x
- Min, B. R., Attwood, G. T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J. S., Barry, T. N., ve McNabb, W. C. (2002). Lotus corniculatus condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*(10), 911–921. <https://doi.org/10.1139/w02-087>
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., ve McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology*, *106*(1–4), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 2010–2037. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- Nishimura, H., Nonaka, G. I., ve Nishioka, I. (1986). Scyllo-quercitol gallates and hexahydroxydiphenolates from quercus stenophylla. *Phytochemistry*, *25*(11), 2599–2604. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84517-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84517-3)
- Nonaka, G., Nishimura, H., ve Nishioka, I. (1985). Tannins and related Compounds. Part26. Isolation and structures of stenophyllanins A, B, and C, novel tannins from Quercus stenophylla. *Journal Chemical Society Perkin Trans.*, *1*(4), 163.

- Ohshima, M., ve McDonald, P. (1978). A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(6), 497–505. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290602>
- Paulot, F., Jacob, D. J., Pinder, R. W., Bash, J. O., Travis, K., ve Henze, D. K. (2014). Ammonia emissions in the United States, european union, and China derived by high-resolution inversion of ammonium wet deposition data: Interpretation with a new agricultural emissions inventory (MASAGE_NH3). *Journal of Geophysical Research*, 119(7), 4343–4364. <https://doi.org/10.1002/2013JD021130>
- Rajasekar, N., Sivanantham, A., Ravikumar, V., ve Rajasekaran, S. (2021). An overview on the role of plant-derived tannins for the treatment of lung cancer. *Phytochemistry*, 188(April), 112799. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112799>
- Rajasekaran, S., Rajasekar, N., ve Sivanantham, A. (2021). Therapeutic potential of plant-derived tannins in non-malignant respiratory diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 94, 108632. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108632>
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., ve Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 326(5949), 123–125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>
- Reed, J. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1516–1528. <https://doi.org/10.2527/1995.7351516x>
- Rinne, M., Nousiainen, J., ve Huhtanen, P. (2009). Effects of silage protein degradability and fermentation acids on metabolizable protein concentration: A meta-analysis of dairy cow production experiments. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1633–1642. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1429>
- Salawu, M. B., Acamovic, T., Stewart, C. S., Hvelplund, T., ve Weisbjerg, M. R. (1999). The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. *Animal Feed Science and Technology*, 82(3–4), 243–259. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00105-4)
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Sepperer, T., Tondi, G., Petutschnigg, A., Young, T. M., ve Steiner, K. (2020). Mitigation of ammonia emissions from cattle manure slurry by tannins and tannin-based polymers. *Biomolecules*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biom10040581>
- Silanikove, N., Nitsan, Z., ve Perevolotsky, A. (1994). Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (cerutoni siliquu) by sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2844–2847.
- Song, H., Che, Z., Cao, W., Huang, T., Wang, J., ve Dong, Z. (2016). Changing roles of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a continuously acidifying soil caused by over-fertilization with nitrogen. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11964–11974. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6396-8>
- Szczurek, A. (2021). Perspectives on tannins. *Biomolecules*, 11(3), 1–3. <https://doi.org/10.3390/biom11030442>
- Tabacco, E., Borreani, G., Croveto, G. M., Galassi, G., Colombo, D., ve Cavallarin, L. (2006). Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4736–4746. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72523-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72523-1)
- Tölä, C., Akbağ, Hİ., Yurtman, İ., ve Savaş, T. (2020). Türkiye’de organik hayvancılık: felsefe ve uygulama. *Hayvansal Üretim*, 61(1), 73–81. <https://doi.org/10.29185/hayuretim.675699>
- Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., John, A., ve Fisher, M. T. (1987). The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on Lotus corniculatus L. *British Journal of Nutrition*, 57(1), 115–126. <https://doi.org/10.1079/bjn19870015>
- Wang, Yue, Li, X., Yang, J., Tian, Z., Sun, Q., Xue, W., ve Dong, H. (2018). Mitigating greenhouse gas and ammonia emissions from beef cattle feedlot production: A system meta-analysis. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 52, Issue 19). <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02475>
- Wang, Yuxi, Waghorn, G. C., Barry, T. N., ve Shelton, I. D. (1994). The effect of condensed tannins in Lotus corniculatus on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphate by sheep. *British Journal of Nutrition*, 72(6), 923–935. <https://doi.org/10.1079/bjn19940096>
- Yaylak, E., ve Kaya, A. (2001). Sığır yetiştiriciliğinde tüm yoğun yem besisi. *Hayvansal Üretim*, 42(2), 15–24.
- Yoshida, T., Ohbayashi, H., Ishihara, K., Ohwashi, W., Haba, K., Okano, Y., Shingu, T., ve Okuda, T. (1991). Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 19(9), 2233.
- Zhu, M., Lai, J. K., ve Wachs, I. E. (2018). Formation of N₂O greenhouse gas during SCR of NO with NH₃ by supported vanadium oxide catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 224, 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.029>