



ISSN 1307-9972

e-ISSN: 1308-0679

YIL/YEAR: 2025

CİLT/VOLUME: 18

SAYI/ISSUE:1

DİCLE ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Dicle University Journal of Faculty of Veterinary Medicine



Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Organıdır
Published by Dicle University Faculty of Veterinary Medicine





Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

<http://dergipark.gov.tr/duvetfd>

ISSN 1307-9972

e-ISSN: 1308-0679

Dicle Univ Vet Fak Derg

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına Sahibi

Prof. Dr. Sadık YAYLA

Atıf Dizinleri



Diğer Dizinler



EDİTÖR GRUBU

Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

Prof. Dr. M. Erdem AKBALIK

Prof. Dr. Duygu Neval SAYIN İPEK

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Şener YILDIZ

Dr. Öğr. Üyesi Nurdan KARACAN SEVER

Dr. Öğr. Üyesi Nahit SAYLAK

DANIŞMA KURULU

Prof. Dr. Abuzer ACAR, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Aytaç AKÇAY, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Muhterem AYDIN, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN, Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Mehmet CENGİZ, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Turgay DEPREM, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Emel ERGÜN, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Aynur GÜLANBER, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Alkan KAMILOĞLU, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Savaş SARIÖZKAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Emrah SUR, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi;

CABI Full-Text, CAB Abstracts Veri Tabanı, TÜBİTAK-ULAKBİM TR Dizin, Türkiye Atıf Dizini (Türkiye Citation Index), Eurasian Scientific Journal Index, Scientific Indexing Services (SIS), Academic Resource Indexing (ResearchBib), Asian Science Citation Index ve Academindex tarafından dizinlenmektedir.

İÇİNDEKİLER/CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALELERİ /RESEARCH ARTICLES

sayfa/page

1	Effect of Medetomidine Administration on Vertebral Heart Score in Scottish Fold Cats	İbrahim Çavuşoğlu, Sıtkıcan Okur	1 - 5
2	Clinical, Radiological and Hematological Evaluation in Cats with Tooth Resorption	Selman Pulat, Kurtuluş Parlak	6 - 12
3	Evaluation of the Effectiveness of Tarantula Cubensis Extract in Cats Diagnosed with Stomatitis	Faruk Türkarlan, Murat Tanrısever, Emine Ünsaldı	13 - 18
4	Siirt-Colored Mohair Goat (Capra Hircus) and Romanov Sheep (Ovis Aries) Determination of Morphometric Features of Hyoid Bone via Three Dimensional Modelling	Muhammed Zahid Atli, Fatma İşbilir, Barış Can Güzel	19 - 22
5	Immunohistochemical Expression of Beclin1 and Lc3 in the Ovary and Oviduct during Early Pregnancy in Rats	Sema Uslu, Füsun Erhan Baycumendur, Elif Nur Taş Kepenek	23 - 27
6	Echinococcus granulosus sensu stricto'nun G1 ve G3 Genotiplerinin Ayrımında PZR-RFLP ve SSCP Metotlarının Eş Zamanlı Kullanımı	Figen Çelik, Muhammed Ahmed Selçuk, Muhammet Usluğ, Afra Sena Tekin, Sami Şimşek	28 - 32
7	Using the MTT Cell Viability Test and Immunocytochemistry Techniques, Benzimidazole's Cytotoxicity and Apoptosis Activation in Mouse 4T1 Cell Culture	Esra Bilici, Büşra Gülbenli Türkoğlu, Senem Akkoç	33 - 37
8	Elazığ'da satılan cevizli sucuk (orcık)'un toplam aflatoksin düzeyinin araştırılması	Pelin Demir, Fatma Nur Şenocak, Yasin Baykalır, Ali Arslan	38 - 41
9	Prevalence of infestation, and risk factors for Otodectes cynotis in Dogs in Kars Region, Türkiye	Nilgün Aydın, Neslihan Ölmez, Mert Sezer, Enes Akyüz, Barış Sarı, Gencay Taşkın Taşçı, Mesut Erdi Işık, Yusuf Umut Batı	42 - 47
10	Iron Metabolism and Haematological Changes in Sheep During The Periparturient Period	Ömer Deniz, Serkan Bozacı, Berrak Işık Soytürk, Abdullah Şimşek, Tarık Şafak, Kenan Çağrı Tümer	48 - 52
11	Tekir Kedisinde Bulbus Oculi'nin Morfometrik Olarak İncelenmesi	Mustafa Korkmaz, Şevval Özdemir, Mehmet Can	53 - 58
12	Ürolitin-A Buzağlarda Gizli Temizlik Skorlarında ve Diyareik Günlerin Sayısında Değişim Sağlayabilir Mi?	Deniz Aliç Ural	59 - 62
13	Investigation of the Effect of Screw Fixation of Sacroiliac Luxation on Pelvic Canal Width Ratio in Cats	Hatice Elif Sever, İrem Sü Satıcı, Zeynep Çimen, Nuriza Zamirbekova Erdoğan, Mustafa Arıcan	63 - 70

DERLEME MAKALELERİ /REVIEW ARTICLES

sayfa/page

14	Siğirlerde İn Vitro Kültürü Etkileyen Çevresel Faktörler	Ayşe Sapcı, Yunus Emre Deniz, Fatma Satılmış	71 - 78
15	Gıda Kaynaklı "Büyük Altı" Tehlikesi	Tahacan Him, Samet Topçuoğlu, Karlo Muratoğlu	79 - 85

Effect of Medetomidine Administration on Vertebral Heart Score in Scottish Fold Cats

İbrahim ÇAVUŞOĞLU^{1,a}, Sitkican OKUR^{1,b,✉}

¹Department of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0003-4190-0403, ^b0000-0003-2620-897X

✉ Corresponding Author

Sitkican OKUR
Department of Veterinary Surgery,
Faculty of Veterinary Medicine,
Atatürk University, Erzurum, TÜRKİYE
sitkican.okur@atauni.edu.tr

Received
30.09.2024

Accepted
27.01.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1558401

How to cite: Çavuşoğlu İ, Okur S
(2025). Effect of medetomidine ad-
ministration on vertebral heart score
in Scottish Fold cats. *Dicle Üniv Vet
Fak Derg.*, 18(1):1-5.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

This study aimed to evaluate the impact of medetomidine on the vertebral heart score (VHS) in Scottish Fold cats. The VHS method, commonly used in veterinary practice, provides a reliable means to assess cardiac size via radiographic imaging. Understanding the effects of sedative drugs on such measurements is essential, particularly in clinical settings involving animals with potential cardiac concerns. A total of 20 Scottish Fold cats, aged between 8 and 48 months and weighing 2.8-5.9 kg, were included in the study. Sedation was induced using an intramuscular injection of medetomidine (80 µg/kg), and radiographic images were obtained at five time points: pre-sedation (T₀) and at 5, 10, 30, and 45 minutes post-administration (T₁-T₄). The VHS was evaluated from left laterolateral (LL) and ventrodorsal (VD) X-rays, and statistical comparisons were performed between these intervals. There was a statistically significant increase in VHS between the pre-sedation (T₀) and 45-minute (T₄) measurements (P<0.05). However, no significant difference was observed at earlier time points (T₁, T₂, and T₃). Additionally, while the cardiac short axis (CSA) showed a slight increase in size post-sedation (P=0.06), the cardiac long axis (CLA) remained unchanged (P=0.40). Medetomidine increased VHS in both LL and VD radiographs, particularly by the 45th minute post-administration. As this alteration impacts both cardiological evaluation and anesthesia safety, reporting these findings is critical for optimizing clinical decision-making. Given the potential for an altered cardiac silhouette, caution is advised when administering medetomidine in Scottish Fold cats with pre-existing heart conditions, as these changes may interfere with clinical assessments of cardiac health.

Key Words: Cardiac size, medetomidine, radiography, Scottish Fold cats, vertebral heart score

Scottish Fold Kedilerinde Medetomidin Uygulamasının Vertebral Kalp Skoruna Etkisi

Öz

Bu çalışma, medetomidinin Scottish Fold kedilerinde vertebral kalp skoru (VHS) üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamıştır. VHS yöntemi, veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ve radyografik görüntüleme yoluyla kalp büyüklüğünü güvenilir bir şekilde değerlendiren bir yöntemdir. Sedatif ilaçların bu tür ölçümler üzerindeki etkilerini anlamak özellikle kardiyak sorunları olan hayvanlar için önemlidir. Çalışmaya, 8 ile 48 ay arasında ve 2.8-5.9 kg ağırlığında 20 Scottish Fold kedisi dahil edilmiştir. Sedasyon, kedilere intramüsküler olarak 80 µg/kg dozunda medetomidin enjeksiyonu ile sağlanmıştır ve radyografik görüntüler sedasyon öncesinde (T₀) ve sedasyon sonrası 5, 10, 30 ve 45 dakikalarda (T₁-T₄) elde edilmiştir. VHS, sol laterolateral (LL) ve ventrodorsal (VD) radyografilerden değerlendirilmiş ve bu zaman dilimleri arasında istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır. Sedasyon öncesi (T₀) ile 45. dakika (T₄) arasındaki VHS'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (P<0.05). Ancak, daha erken zaman noktalarında (T₁, T₂ ve T₃) anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, sedasyon sonrası kalp kısa eksen (CSA) boyutunda hafif bir artış gözlenmiş (P=0.06), ancak kalp uzun eksen (CLA) değişmemiştir (P=0.40). Medetomidin, hem LL hem de VD radyografilerinde VHS artışına neden olmuş, özellikle sedasyondan 45 dakika sonra belirgin hale gelmiştir. Bu değişiklik hem kardiyolojik değerlendirmeyi hem de anestezi güvenliğini etkilediğinden, bu bulguların rapor edilmesi klinik karar alma süreçlerini iyileştirmek açısından kritik öneme sahiptir. Kalp silüetindeki bu değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda, medetomidinin klinik kardiyak değerlendirmeleri etkileyebileceği ve mevcut kalp rahatsızlıkları olan Scottish Fold kedilerine uygulanırken dikkatli olunması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kalp büyüklüğü, medetomidin, radyografi, Scottish Fold kedileri, vertebral kalp skoru

INTRODUCTION

Vertebral heart score (VHS) or vertebral heart size is a method used to assess cardiac size in thoracic radiographs and was first applied to cats by Lister and Buchanan (1). This technique involves measuring the long and short axes of the heart on thoracic radiographs, which are then compared to thoracic vertebrae to calculate a numerical score. The measurements are typically taken using a digital caliper or computer-based imaging software, with the length of the heart's long and short axes being compared to the vertebral bodies starting from the fourth thoracic vertebra. This measurement provides veterinarians with an estimate of heart size and is an essential tool for evaluating cardiac enlargement in animals (2-4).

Knowing the reference VHS values is crucial for veterinarians to assess potential heart enlargement. Although there are slight variations between VHS values obtained from dorsoventral (DV) and ventrodorsal (VD) thoracic radiographs in cats, the lateral thoracic radiograph is generally considered the most reliable method for VHS assessment. VHS is an important diagnostic tool in veterinary cardiology because it is easy to apply, requires no advanced equipment, and can be interpreted by clinicians to make informed decisions regarding a patient's cardiac health (1,5).

Preanesthesia, or premedication, is a preparatory stage aimed at minimizing stress in animals, facilitating the transition to anesthesia, and reducing the required dosage of anesthetic agents. This also increases the safety and consistency of the anesthesia process (6). Sedation, involving the use of sedative drugs to calm the animal, is an essential part of premedication. These approaches help to reduce stress and make the anesthesia process more comfortable and safer for the animal (6,7).

Medetomidine, an α_2 -adrenoreceptor agonist, is commonly used in cats and dogs for sedation, muscle relaxation, calm awakening, and analgesia. It can be used alone or in combination with opioids for minor surgical interventions or premedication. Medetomidine has a depressant effect on the cardiovascular system, causing hypertension followed by bradycardia and hypotension. However, bradycardia is less commonly observed in cats. Cyanosis, dysrhythmia, and bradycardia caused by medetomidine can be reversed with an α_2 -antagonist called atipamezole (6,8).

The objective of this study was to assess the effects of medetomidine on VHS and cardiac dimensions in Scottish Fold cats, a popular breed in veterinary practice. By investigating these parameters, this study seeks to provide insight into the radiographic changes induced by medetomidine, particularly its

potential to alter heart size measurements, which are vital for evaluating cardiac health in clinical settings.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted following the principles of animal welfare and ethics. Informed consent was obtained from the owners of all cats included in the study.

A total of 20 Scottish Fold cats (12 females and 8 males), aged between 8 and 48 months and weighing 2.8 to 5.9 kg, were selected for this study. Inclusion criteria required that all cats presented normal findings on physical examination, complete blood cell counts, and serum biochemistry analyses. To reduce the risk of aspiration from medetomidine-induced vomiting, the cats were fasted for 8 hours prior to the procedure, with water being withheld for 2 hours before sedation. The intramuscular dose of medetomidine (Domitor; Zoetis, Espoo, Finland) was calculated based on body weight, with 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ being administered. Doses were carefully measured using 1 ml single-use syringes (Genject; Ankara, Turkey).

After sedation, heart rate, body temperature, and respiratory rate were continuously monitored using a veterinary bedside monitor (Hasvet 838 PM), with probes attached to the tongue and rectum. Monitoring continued until the sedation was reversed. At the conclusion of the experiment, atipamezole (Antisedan; Zoetis, Espoo, Finland) was administered intramuscularly at a dose of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to counteract the sedation.

Radiographs were obtained immediately before sedation (T_0) and at 5 minutes (T_1), 10 minutes (T_2), 30 minutes (T_3), and 45 minutes (T_4) following medetomidine administration. For each time point, left laterolateral (LL) and ventrodorsal (VD) radiographs were taken using a C-arm fluoroscope (Trophy Radiologie France, Vincennes, CEDEX). For LL radiographs, settings were adjusted to 65 kV and 8 mAs, while VD radiographs were taken with settings at 63 kV and 8 mAs. The radiographs were automatically transferred to a computer-based radiography system (Fujifilm FCR Prima T2), where the VHS and cardiac axis dimensions (short and long axes) were measured. VHS was calculated by measuring the heart's short and long axes and comparing these values to the length of the thoracic vertebrae, starting from the fourth vertebra caudally. The sum of these vertebral lengths provides the VHS score. Both the LL and VD radiographs were analyzed for VHS and cardiac short/long axis measurements (Figure 1).

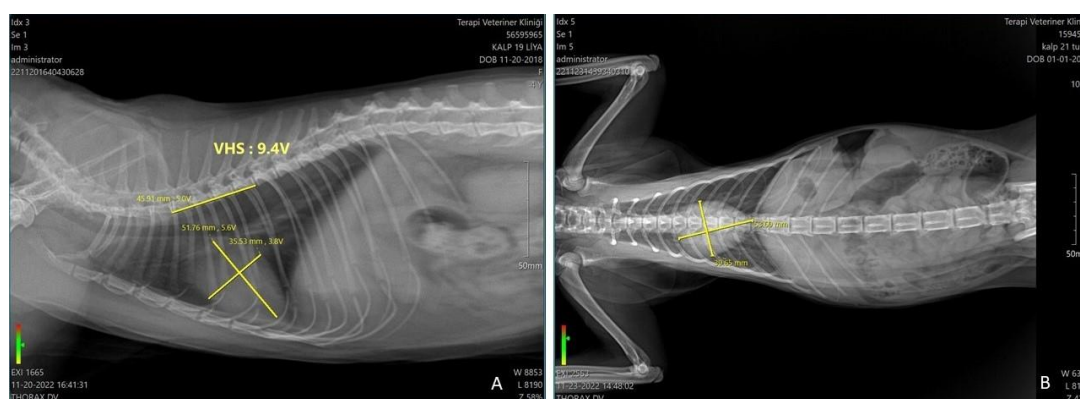


Figure 1. Measurement of Vertebral Heart Score (A) and Cardiac long and short axis (B) in a Scottish Fold cat

Statistical Analysis

All data were analyzed using commercial statistical software (MedCalc version 20.011, MedCalc Software, Ostend, Belgium). The normality of the data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Changes in VHS scores over time were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA). When the assumption of sphericity was violated, Greenhouse-Geisser or Huynh-Feldt corrections were applied. Paired sample t-tests were used to compare cardiac short axis (CSA) and cardiac long axis (CLA) measurements before (T_0) and after (T_4) sedation. All results are presented as mean $\pm$ standard deviation, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

All 20 Scottish Fold cats successfully completed the study without any significant complications during the sedation

procedure or radiographic assessments. The average age of the cats was 22.2 ± 14.2 months, and their average body weight was 3.6 ± 0.9 kg. During the sedation process, 3 cats experienced vomiting, which resolved without further intervention. Five cats required repeated radiographic imaging due to movement during the initial attempts. All animals recovered fully after the administration of the reversal agent, atipamezole.

The mean VHS values obtained at each time point are summarized in Table 1. Statistical analysis revealed a significant increase in VHS between the pre-sedation (T_0) measurement and the 45-minute post-sedation (T_4) measurement ($P < 0.05$). However, no significant differences were observed between T_0 and the earlier time points (T_1 , T_2 , and T_3). While the VHS value increased slightly over time, only the T_0 to T_4 difference reached statistical significance, indicating that medetomidine caused a measurable change in heart size at the 45-minute mark (Table 2).

Table 1. Vertebral Heart Score measurement at different time points in Scottish Fold cats

n	Gender	Age (month)	Weight (kg)	Time-points				
				T_0	T_1	T_2	T_3	T_4
1	Female	23	3.6	9.5	9.5	9.6	9.6	9.6
2	Female	12	2.9	9.7	9.7	9.7	9.7	9.8
3	Male	27	5.9	9	9	9	9	9
4	Female	12	3.2	9.8	9.8	9.8	9.8	9.9
5	Male	9	3.1	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
6	Female	11	3	10.1	10.2	10.2	10.3	10.3
7	Female	38	3.5	9.9	9.9	10	10	10
8	Female	26	2.9	10.1	10.1	10.2	10.3	10.3
9	Male	14	3.2	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4
10	Male	48	4.1	9.1	9	9	9	9
11	Female	8	3	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4
12	Female	48	3.1	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2
13	Male	10	3.4	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
14	Female	8	2.8	8.7	8.6	8.7	8.6	8.6
15	Male	10	3	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
16	Female	16	3.1	9.5	9.5	9.6	9.6	9.6
17	Male	22	5.4	9.5	9.5	9.5	9.6	9.6
18	Male	18	4.6	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
19	Female	48	3.7	9.4	9.4	9.5	9.4	9.4
20	Female	36	4.8	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1
Mean $\pm$ SD		22.2 $\pm$ 14.1	3.6 $\pm$ 0.9	9.39$\pm$0.6	9.39$\pm$0.6	9.42$\pm$0.61	9.43$\pm$0.63	9.44$\pm$0.64*

*Significant difference from T_0 ($P < 0.05$). Data expressed mean + standard deviation (SD).

Table 2. Cardiac short and long axis measurement at two different time point in Scottish Fold cats

Measurement	Time-points		P-value
	T_0	T_4	
Cardiac short axis	37.3 $\pm$ 3.2	37.7 $\pm$ 3.2	0.06
Cardiac long axis	56.6 $\pm$ 4.6	56.9 $\pm$ 5.0	0.40

*Significant difference from T_0 ($P < 0.05$). Data expressed mean + standard deviation (SD).

In addition to LL radiographs, VD radiographs were obtained at T_0 and T_4 to evaluate the changes in CSA and CLA. The results are shown in Table 2. Although the CSA showed a slight increase at T_4 compared to T_0 , this change was not statistically significant ($P = 0.06$). Likewise, no significant difference was found in the CLA measurements between T_0 and T_4 ($P = 0.40$).

Further analysis was conducted to assess whether there were significant differences in VHS measurements between male and female cats. No statistically significant difference was found between the VHS measurements of male cats (9.6 ± 0.7) and female cats (9.5 ± 0.6) at any time point ($P > 0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSION

This study aimed to evaluate the effect of medetomidine on the VHS and cardiac dimensions in Scottish Fold cats. Our findings indicate that medetomidine significantly increased VHS over a 45-minute period, particularly in LL radiographs, while its impact on the CSA and CLA in VD radiographs was less pronounced. These results are consistent with previous studies highlighting the cardiovascular effects of α_2 -adrenergic agonists, particularly their ability to alter heart size due to peripheral vasoconstriction and bradycardia (7,9).

Medetomidine is known to cause significant cardiovascular effects, including bradycardia, peripheral vasoconstriction, and changes in cardiac output. These effects are mediated by its action on central and peripheral α_2 -adrenoceptors, which reduce sympathetic outflow and increase systemic vascular resistance. The significant increase in VHS observed between the baseline (T_0) and 45 minutes post-administration (T_4) in this study suggests that medetomidine induces changes in cardiac morphology that may be linked to these physiological response (6,10).

The increase in VHS observed in this study is in line with findings from previous studies that reported increases in cardiac size following administration of α_2 -agonists such as medetomidine. This increase may be attributed to the drug's ability to prolong the diastolic filling phase due to bradycardia, thus increasing the volume of the heart visible on radiographs (9,11). Although the differences observed at earlier time points (T_1 , T_2 , and T_3) were not statistically significant, the 45-minute interval (T_4) provided enough time for the physiological effects of medetomidine to manifest fully, leading to the observed VHS increase (11).

Although a slight increase in CSA was observed between T_0 and T_4 in VD radiographs, this change did not reach statistical significance. Similarly, the CLA measurements remained unchanged throughout the study period. This suggests that while medetomidine may have a more noticeable impact on VHS in LL views, its effects on other cardiac dimensions, particularly in VD views, are less pronounced. This discrepancy may be due to the inherent differences between LL and VD radiographic projections. LL projections are typically more sensitive to changes in the cardiac silhouette, while VD views often overlap with other thoracic structures, making it harder to discern subtle cardiac changes (12,13).

The findings of this study have important clinical implications, especially in cases where medetomidine is used as a sedative in animals with suspected or confirmed cardiac disease. The increase in VHS observed following medetomidine administration suggests that the drug may artificially enlarge the heart silhouette in radiographs, potentially leading to a misdiagnosis of cardiomegaly or other cardiac abnormalities. For this reason, it is essential that veterinarians exercise caution when interpreting radiographs taken from sedated animals, particularly those with pre-existing cardiac conditions. In clinical practice, medetomidine is commonly used for its sedative and analgesic properties, often in combination with other drugs such as opioids. However, as this study demonstrates, its use can significantly impact radiographic findings, particularly those related to heart size. Clinicians should be aware of these potential changes and consider alternative sedatives when evaluating animals with known cardiovascular issues.

The results of this study align with previous research that has reported medetomidine impact on the cardiovascular system. Studies in dogs have shown similar increases in VHS following administration of dexmedetomidine, another α_2 -adrenergic agonist, further supporting the hypothesis that this class of drugs induces measurable changes in cardiac morphology (11). In one such study, dexmedetomidine administration was associated with significant increases in heart size as seen on radiographs, leading to the recommendation that this drug should be used with caution in cats undergoing cardiac evaluation (9).

Additionally, research on the effects of α_2 -agonists on cardiac output has consistently demonstrated their ability to reduce cardiac output by as much as 50%, a factor that may contribute to the changes in heart size observed in this study. Although the reduction in output is often accompanied by increases in systemic vascular resistance and blood pressure, these effects are transient and tend to normalize over time (14-15). The timing of radiographs, therefore, plays a critical role in capturing the full extent of these cardiovascular changes, which is reflected in the significant changes observed at T_4 but not at earlier time points (16).

Given that medetomidine is widely used for sedation in veterinary practice, it is critical for clinicians to be aware of its potential to alter heart size measurements in radiographs. These changes may lead to misinterpretation of radiographic findings, especially in cases where cardiomegaly or other heart conditions are suspected. For this reason, caution is advised when using medetomidine in animals undergoing cardiac evaluations, particularly those with pre-existing heart disease. Future studies should investigate the effects of medetomidine on animals with cardiovascular conditions and compare its effects to other commonly used sedatives. This would provide further insights into how different sedatives affect radiographic assessments and contribute to more accurate diagnoses in clinical practice.

ACKNOWLEDGEMENT

This study is derived from the Master's thesis research conducted by İbrahim Çavuşoğlu.

FINANCIAL SUPPORT

No support was received from any organization in the conduct of this research

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest to be declared by the authors

AUTHOR CONTRIBUTIONS

İÇ and SO took part in the study planning, sample collection, the writing of the study and final check.

ETHICAL STATEMENT

The study was approved by the Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (HAYDEK) on August 18, 2022, with approval number 171.

REFERENCES

1. Litster AL, Buchanan JW (2000). Vertebral scale system to measure heart size in radiographs of cats. *J Am Vet Med Assoc.*, 216(2):210-214.
2. Buchanan JW, Bücheler J (1995). Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc.*, 206(2):194-199.
3. Spasojević-Kosić L, Krstić N, Trailović R (2007). Comparison of three methods of measuring vertebral heart size in German shepherd dogs. *Acta Vet-Beograd.*, 57(2-3):133-141.
4. Doğan E, Okur S, Hayirli A, Okumuş Z (2022). Vertebral heart score and cardiothoracic ratio in Wistar rats. *Ankara Univ Vet Fak Derg.*, 1-16.
5. Ghadiri A, Avizeh R, Rasekh A, Yadegari A (2008). Radiographic measurement of vertebral heart size in healthy stray cats. *J Feline Med Surg.*, 10(1):61-65.
6. Grimm K, Lamont L, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson S (Eds.) (2015). *Veterinary anesthesia and analgesia*. John Wiley & Sons, Hoboken.
7. Sinclair MD (2003). A review of the physiological effects of α_2 -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J.*, 44(11):885-897.
8. Guzel O, Kaya DA, Altunatmaz K, Sevim G, Sezer D, Erdikmen DO (2018). Evaluation of the cardiorespiratory effects of the α_2 adrenoceptor agonists xylazine, medetomidine, and dexmedetomidine in combination with ketamine in dogs. *Vet Med.*, 63(12):546-554.
9. Zwicker LA, Matthews AR, Côté E, Andersen E (2016). The effect of dexmedetomidine on radiographic cardiac silhouette size in healthy cats. *Vet Radiol Ultrasound.*, 57(3):230-236.
10. Yaygingül R, Belge A (2018). The comparison of clinical and cardiopulmonary effects of xylazine, medetomidine, and detomidine in dogs. *Ankara Univ Vet Fak Derg.*, 65(3):313-322.
11. Wang HC, Hung CT, Lee WM, Chang KM, Chen KS (2016). Effects of intravenous dexmedetomidine on cardiac characteristics measured using radiography and echocardiography in six healthy dogs. *Vet Radiol Ultrasound.*, 57(1):8-15.
12. Gutiérrez A, Ezquerro LJ, Rodríguez PL, Jiménez J (2022). Cardiac radiographic measurements in ferrets using the Osirix MD programme. *Front Vet Sci.*, 8:795947.
13. Tangpakornsak T, Saisawart P, Sutthigran S, et al. (2023). Thoracic vertebral length-to-height ratio: A promising parameter to predict the vertebral heart score in normal Welsh Corgi Pembroke dogs. *Vet Sci.*, 10(2):168.
14. Lemke KA (2004). Perioperative use of selective α_2 agonists and antagonists in small animals. *Can Vet J.*, 45(6):475.
15. Guan M, Fanelli D, Verbeek T, Warfield DJ, Liu H (2023). α_2 adrenergic agonists. In: Li J, Jiang W, Vadivelu N (eds). *First Aid Perioperative Ultrasound*. Springer, Cham.
16. Rolfe NG, Kerr CL, McDonnell WN (2012). Cardiopulmonary and sedative effects of the peripheral α_2 -adrenoceptor antagonist MK 0467 administered intravenously or intramuscularly concurrently with medetomidine in dogs. *Am J Vet Res.*, 73(5):587-594.

Clinical, Radiological and Hematological Evaluation in Cats with Tooth Resorption

Selman PULAT^{1,a,✉}, Kurtuluş PARLAK^{1,b}

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, TÜRKİYE

ORCID: ^a0009-0004-3874-8337, ^b0000-0002-8656-037X

✉ Corresponding Author

Selman PULAT

Department of Surgery, Faculty of
Veterinary Medicine, Selçuk
University, Konya, TÜRKİYE

selmanpulatt54@gmail.com

Received

10.12.2024

Accepted

17.02.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1599449

How to cite: Pulat S, Parlak K (2025).

Clinical, radiological and
hematological evaluation in cats with
tooth resorption. *Dicle Univ Vet Fak
Derg.*, 18(1):6-12.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

This study aimed to investigate tooth resorption (TR), a common dental disease in cats. Conducted on 35 cats admitted to Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital for oral health issues or castration, the study evaluated the prevalence of TR, the distribution of affected teeth, and the relationship between resorption types and stages. Clinical and radiographic examinations were performed, and blood parameters were analyzed. The findings indicated that TR prevalence increases with age and is most commonly observed in mandibular third premolars and first molars. Blood analyses revealed sodium and phosphorus levels outside the reference ranges in many cases, suggesting electrolyte and metabolic imbalances. A significant relationship was observed between TR stages and types; Type 1 lesions were predominant in early stages, while Type 3 lesions increased in advanced stages. In conclusion, TR is not solely a localized periodontal condition but also has systemic effects. A multidisciplinary approach is recommended for the early diagnosis and prevention of TR progression. Further investigation of environmental, genetic, and metabolic factors may contribute to the development of effective management strategies for this disease.

Key Words: Cat, dental radiography, tooth resorption

Diş Rezorpsiyonlu Kedilerde Klinik, Radyolojik ve Hematolojik Değerlendirme

Öz

Bu çalışmanın amacı kedilerde yaygın bir diş hastalığı olan diş rezorpsiyonunu (TR) araştırmaktır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne ağız sağlığı sorunları veya kastrasyon nedeniyle başvuran 35 kedi üzerinde yürütülen çalışmada, TR'nin yaygınlığı, etkilenen dişlerin dağılımı ve rezorpsiyon tipleri ile evreleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Klinik ve radyografik muayeneler yapıldı ve kan parametreleri analiz edildi. Bulgular TR prevalansının yaşla birlikte arttığını ve en yaygın olarak mandibular üçüncü premolar ve birinci molar dişlerde görüldüğünü göstermiştir. Kan analizleri, birçok vakada referans aralıklarının dışında sodyum ve fosfor seviyeleri ortaya çıkarmış, bu da elektrolit ve metabolik dengesizlikleri düşündürmüştür. TR evreleri ve tipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir; Tip 1 lezyonlar erken evrelerde baskınken, Tip 3 lezyonlar ileri evrelerde artmıştır. Sonuç olarak, TR sadece lokalize bir periodontal durum olmayıp sistemik etkileri de vardır. TR'nin erken teşhisi ve ilerlemesinin önlenmesi için multidisipliner bir yaklaşım önerilmektedir. Çevresel, genetik ve metabolik faktörlerin daha fazla araştırılması, bu hastalık için etkili yönetim stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Dental radyografi, diş rezorpsiyonu, kedi

INTRODUCTION

Tooth resorption (TR) is a common and important dental disease in cats. The term tooth resorption has been named in different ways from past to present, but the term “tooth resorption (TR)” accepted by the American Veterinary Dental College (AVDC) is the most commonly used one (1). The disease is characterized by a resorption of the cementum layer or enamel surface of the tooth caused by polynuclear cells called odontoclasts. As a result of tooth root loss, tooth destruction destabilizes the crown, causing it to fracture (2-4). The disease is diagnosed based on clinical examination and radiographic findings (3). It has been reported that the prevalence of tooth resorption in domestic cats ranges from 20% to 75% and both the incidence and the number of affected teeth increase with age (5-6).

A number of predisposing factors for TR have been identified. The most widely documented association in the literature is increasing age (3,5). Other associations investigated include bacteria in dental plaque, diet (high acidity in dry foods damages both enamel and cementum, and overfeeding with raw liver may contribute to the disease because both retinol and tretinoin in liver can directly stimulate the activity of clastic cells.), the presence of occlusal stress that can cause microfractures on the surface of the cementum (these microfractures can cause inflammation of the cementum or periodontal ligament and the attraction of odontoclasts, leading to TR), and even acid regurgitation of hairballs can cause lesions in these hard tissues (3,7-9). In addition, the consistency of commercial cat foods may affect the functional integrity of the periodontal ligament, leading to tooth resorption, and Ca or Mg deficiency has also been reported in affected cats (10,11). Studies have suggested that TR lesions in cats are associated with *feline immunodeficiency virus (FIV)* and *feline herpes virus-1 (FHV-1)*, but the results are controversial due to the lack of material in the studies and the fact that the study was not supported by dental x-rays (12). Another study showed that there was no association between TR and *feline calicivirus (FCV)* (13,14).

The relationship between TR and other dental diseases is complex. It has been reported that cats with dental diseases (gingivitis, tartar or periodontal disease) have a four to five times higher risk of resorptive lesions than those without previous dental disease (15).

It has been suggested that systemic disorders may also be associated with TR in cats. The calcium-vitamin D-parathyroid hormone (PTH) system is involved in the activation of osteoclastic bone resorption; however, only serum concentration of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) has been associated with TR. The role of the calcium-vitamin D PTH system in the formation of TR remains unclear (9,16).

The aim of this study was to evaluate the prevalence of TR, the distribution of affected teeth and the relationship between the types and stages of resorption in cats diagnosed with tooth resorption (TR) by intraoral radiographic examination, clinical examination and laboratory analysis.

MATERIAL AND METHODS

The material of this study consisted of cats that were admitted to Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital with oral problems or were anesthetized for

castration. A total of 35 cats older than 1 year with different breed, sex and body weight characteristics were included in the study, which were diagnosed with tooth resorption after clinical and radiographic examinations. After taking anamnesis for each patient, a comprehensive physical examination was performed and the findings were recorded on a standardized examination form. Blood samples were taken for hematological measurements (blood gas analysis, complete blood count and serum biochemistry profiles) and detailed clinical and radiographic examinations were performed under sedation or general anesthesia. Owners were informed in detail about the purpose of the study, the procedures to be performed and the potential risks, and a signed consent form was obtained indicating that they consented to the inclusion of their cats in the study. The diagnosis of tooth resorption was based on the results of anamnesis, clinical examination and intraoral radiographic evaluations (Figure 1).



Figure 1. Clinical examination of tooth 404 with dental probe in a cat with tooth resorption

Anesthesia Administration

For the diagnosis of resorptive lesions, all cats underwent sedation and general anesthesia. Induction of anesthesia was achieved using a combination of 0.4 mg/kg butorphanol hydrogen tartrate (Butomidor® 10 mg/ml, Richter Pharma, Austria) and 0.05 mg/kg medetomidine hydrochloride (Domitor®, Orion Pharma, Finland) intramuscularly. Subsequently, general anesthesia was induced by intravenous (IV) administration of 4 mg/kg propofol (Propofol-Lipuro 1% [10 mg/ml], B. Braun, Portugal). Under anesthesia, intraoral radiographic scans were performed and safety and stabilization of the cats were ensured during radiographic imaging. At the same time, the necessary samples were taken for laboratory analysis. After completion of the procedures, the

cats were safely awakened from anesthesia by intramuscular injection of 0.125 mg/kg atipamezole hydrochloride (Antisedan® 5 mg/ml, Orion Pharma, Finland).

Radiographic Examination

X-rays of each cat's teeth were taken and digitally recorded using parallel technique, bisection angle technique (17) and simplified technique (18,19) with Planmeca Pro-X Periapical X-Ray Device DC, Planmeca ProSensor RVG device (Size: 1) and Planmeca Romexis software patient tracking and imaging software program (Figure 2). The radiographic images were recorded on the examination forms by determining the types and stages of resorption for each tooth based on the anatomical and radiological classification system of AVDC.



Figure 2. Dental X-ray

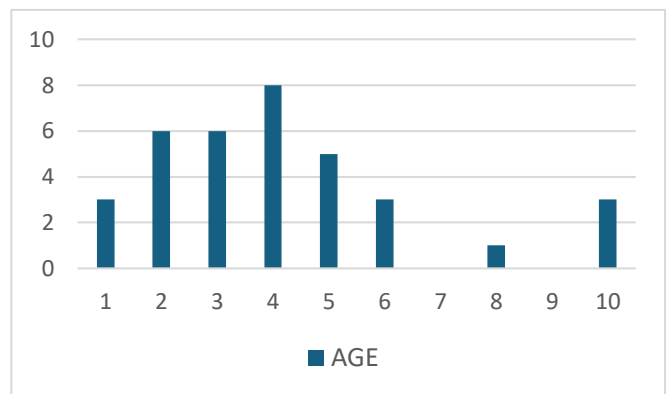
Statistical Analysis

Age, sex, breed distribution and teeth affected by tooth resorption in cats diagnosed with TR were evaluated by calculating the mean. Chi-square analysis was performed to evaluate the relationship between TR stage and TR type in the teeth diagnosed with TR.

RESULTS

The mean age of the 35 cats diagnosed with tooth resorption was 4.17 (years) (Chart 1), gender distribution was 19 males (54.2%) and 16 females (45.7%); breed distribution was 20 Domestic Short Hair mixed breed (57%), 7 British (20%), 2 Van Cat (5.7%), 2 Siamese (5.7%), 2 Scottish Fold (5.7%), 1 Persian (2.8%) and 1 Bombay (2.8%). The diet of the cats was as follows: mixed diet (65.7%) (home cooked diet, dry food and wet food), dry food (17.1%), dry and wet food together (17.1%). It was determined that 60% of the cats were vaccinated and 40% were unvaccinated.

Chart 1. Age distribution of cats with TR



In the routine clinical examination of 35 cats with TR, type 2 resorption (38.21%), followed by type 1 (36.94%) and type 3 (24.84%) resorption according to AVDC scoring was found most frequently (Figure 3). The highest rate of tooth resorption was observed in tooth 409 (15.28%). This was followed by teeth 309 (8.91%), 407 (8.28%), 108 (8.28%), 307 (7.64%), 408 (6.36%), 308 (6.36%) and 208 (6.36%) (Table 1).

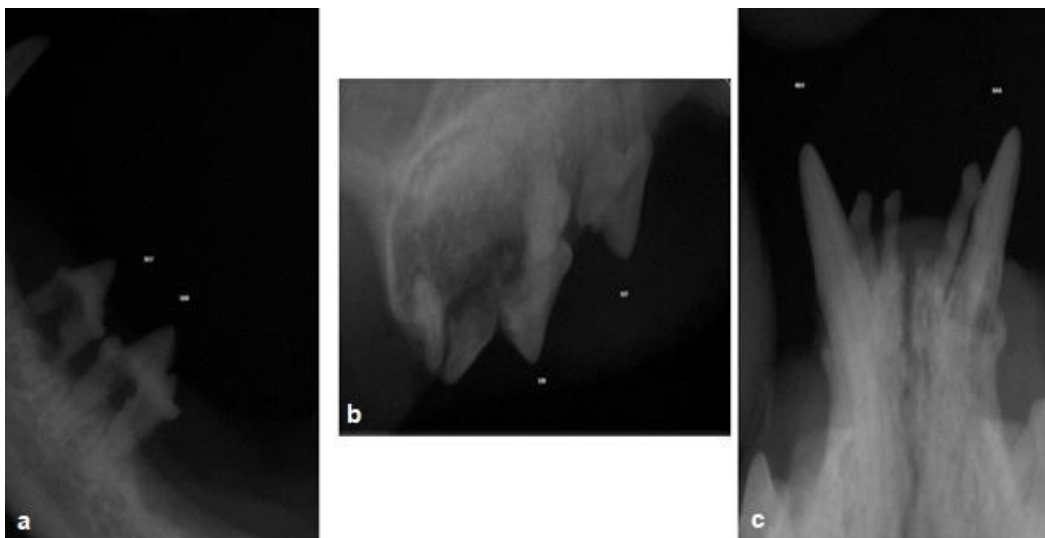


Figure 3. A: Type 1 resorption in teeth 307 and 308. B: Stage 4 and Type 3 resorption in tooth 108, C: Type 2 resorption in teeth 304 and 404.

Table 1. Percentages of 157 teeth diagnosed with tooth resorption according to Modified Triadan Numbering

Modified Triadan Tooth Numbering	Affected by TR (n=157)
102	157/1 (0.63%)
103	157/1 (0.63%)
104	157/8 (5.09%)
201	157/1 (0.63%)
202	157/2 (1.27%)
204	157/7 (4.45%)
301	157/1 (0.63%)
302	157/1 (0.63%)
303	157/1 (0.63%)
304	157/9 (5.73%)
403	157/1 (0.63%)
404	157/8 (5.09%)
107	157/4 (2.54%)
108	157/13 (8.28%)
206	157/1 (0.63%)
207	157/4 (2.54%)
208	157/10 (6.36%)
307	157/12 (7.64%)
308	157/10 (6.36%)
309	157/14 (8.91%)
407	157/13 (8.28%)
408	157/10 (6.36%)
409	157/24 (15.28%)

In this study, blood parameters of 35 cats diagnosed with TR were analysed and the results were evaluated for compliance with reference ranges. Although most parameters were within the reference ranges, some parameters showed significant deviations. WBC levels exceeded the reference range in 22%, sodium (Na) levels in 85%, calcium (Ca) levels in 48% and glucose levels in 14% of cases. On the other hand, pH levels fell below the reference range in 31% and HB levels in 5% of cases. These findings indicate that marked changes in some haematological and biochemical parameters may occur in cats diagnosed with TR.

When chi-square analysis was performed to examine the relationship between TR stage and TR type, a significant relationship was found between TR stage and TR type evaluated on the same tooth ($\chi^2 = 83.052$; $df = 12$; $P < 0.001$). A moderate relationship was found (Cramer's V = 0.514; $P < 0.001$). TR Type 1 was more prevalent in teeth in Stages 1 and 2. Fifty percent of the teeth in Stage 1 and 28.5% of the teeth in Stage 2 were classified as TR Type 1. TR Type 3 was more predominant in teeth in Stages 3, 4 and 5. 28.5% of the teeth in Stage 3, 60-100% of the teeth in Stage 4 (4a, 4b, 4c) and 100% of the teeth in Stage 5 were classified as TR Type 3. These results suggest that tooth resorption may be associated with different TR types as it progresses and that TR Type 3 is more predominant in advanced stages (Table 2).

Table 2. Relationship between DR stage and DR type according to the number of resorbed teeth

TR Type	TR Stage						
	1 (n=4)	2 (n=42)	3 (n=7)	4a (n=3)	4b (n=5)	4c (n=85)	5 (n=11)
1	2/4 ^{ab} (%50)	21/42 ^{ab} (%50)	5/7 ^b (%71.4)	1/3 ^{abc} (%33.3)	1/5 ^{abc} (%20)	5/85 ^c (%5.85)	-
2	2/4 ^a (%50)	12/42 ^a (%28.5)	-	-	1/5 ^{ab} (%20)	4/85 ^b (%4.70)	-
3	-	9/42 ^a (%21.4)	2/7 ^a (%28.5)	2/3 ^{ab} (%66.6)	3/5 ^{ab} (%60)	76/85 ^b (%89.4)	11/11 ^b (%100)

Values with different superscripts in a row are significantly different at $p < 0.05$.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, the diagnosis of TR was first made by clinical examination of the teeth with a dental probe and then confirmed by radiographic examinations. In a study by Eriksson et al. (20), the sensitivity of dental radiography was reported as 78.9% and specificity as 100%, while the sensitivity of oral clinical examination was only 36.0% and specificity as 99.9%. These findings suggest that TR in cats is much more common than expected and that cases that may be missed on clinical examination can be easily detected by radiographic evaluation. In cats with suspected TR, dental radiographic examination is strongly recommended to confirm the diagnosis.

Previous studies have demonstrated that both the prevalence and the number of teeth affected by tooth resorption in cats increase with advancing age (10,21). Furthermore, it has been reported that the risk of developing resorptive lesions rises by 1.78 times with each additional year of age (21). In the present study, all cats included were aged one year or older, with the mean age of cats in the tooth resorption (TR) group calculated to be 4.17 years. This finding is in parallel with the literature reporting that the incidence of TR increases with age (22). However, the fact that TR cases were detected even in 1-year-old cats in our study indicates

that this disease may start at an earlier age. This was also emphasized by DeLaurier et al. (23) in a histologic study of early resorptive lesions. However, O'Neill et al. (24) found that the median age of cats with TR (9.47 years) was significantly higher than that of cats without TR (4.94 years) and stated that age is one of the strongest risk factors for TR. In our study, regular dental check-ups from a young age are recommended for early diagnosis of TR and prevention of its progression.

In terms of breed factor, the highest prevalence of TR was found in Domestic Short Hair (48.5%) and British (20%) breeds in our study. Similarly, O'Neill et al. (24) reported a high prevalence of TR in Siamese (18.7%) and suggested that some races may have a genetic predisposition to this disease. However, Gorrel (4) emphasized that conflicting results regarding racial predisposition have been reported in different studies. While some studies have suggested that TR is more common in certain breeds (21), other studies have reported that the difference between breeds is not significant (23). These contradictions suggest that in addition to genetic factors, environmental conditions, care practices and dietary habits may also play an important role in the development

of TR. For example, Gorrel and Larsson (10) discussed the potential impact of environmental and diet-related factors on the incidence of TR and reported that consumption of hard food may reduce the risk of TR in some breeds. The literature suggests that diets high in carbohydrate content are associated with an increased risk of periodontal diseases and may indirectly contribute to the development of TR (21). In our study, the highest prevalence of TR was observed in mixed-breed cats, which may reflect not only a potential genetic predisposition but also the influence of environmental factors and care practices. Mixed-breed cats typically exhibit greater genetic diversity, which could interact with external factors such as diet, living conditions, and overall care to increase susceptibility to TR. On the other hand, the high prevalence observed in the British breed supports the importance of genetic factors since this breed is a more genetically homogeneous population. These findings suggest that TR is not only a genetic disease, but also environmental and management factors need to be considered. In order to obtain more comprehensive results, genetic analyses among different breeds and large-scale studies evaluating the impact of environmental factors will be needed.

Of the 35 cats with tooth resorption evaluated, 16 were neutered (45.7%) and 19 were not neutered (54.3%). This suggests the possibility that neutering may have a significant effect on the development of TR. In the literature, the effects of neutering on metabolism and the incidence of some systemic diseases have been reported. For example, Whyte et al. (25) suggested that obesity, insulin resistance and low movement levels may increase the risk of TR in neutered cats. On the other hand, it is known that higher levels of testosterone and estrogen in unneutered cats may play a role in the preservation of tooth and bone tissue (4). These findings suggest that more extensive studies are needed to understand the effects of neutering on the development of TR.

In our study, the majority of cats with tooth resorption (TR) were found to be fed a mixed diet (48.6%), while 31.4% were fed exclusively dry food, and 20% were provided with a combination of dry and wet food. These findings highlight the potential role of diet in influencing dental health. Gorrel and Larsson (10) reported that hard structured kibble mechanically cleans tooth surfaces and reduces plaque formation. However, it has been reported that mixed and wet food consumption may lead to more plaque and tartar accumulation on the tooth surface, which may increase the risk of TR (21). In our study, mixed diet was more common among cats with TR, indicating that more research is needed to understand the role of diet in the pathogenesis of TR.

When the vaccination schedule was evaluated, it was determined that 45.7% of the cats diagnosed with TR were vaccinated regularly, while 54.3% were vaccinated irregularly or not vaccinated at all. The positive effects of vaccination on systemic immunity may also be important for dental health. Whyte et al. (26) reported a higher incidence of periodontal disease and tooth resorption in immunocompromised cats. In our study, the higher incidence of TR in irregularly vaccinated cats points to the indirect effects of the immune system on the development of TR. This finding suggests that regular vaccination practices may positively affect not only general health but also dental health.

In studies conducted to determine the most commonly affected teeth in terms of tooth resorption in cats, it was observed that some teeth were affected at a higher rate. In a study conducted by Girard et al. (27) on 60 cats, it was reported that TR was most commonly seen on maxillary 3rd and 4th premolars (107, 207, 108, 208) and mandibular 3rd and 4th premolars (307, 407, 308, 408). Similarly, DuPont (28) reported that TR in cats was concentrated on mandibular 3rd and 4th premolars (307, 407, 308, 408) and maxillary 3rd premolars (107, 207) in 67% of cases and mandibular 1st molars (309, 409) were among the most frequently affected teeth. The study also reported that TR was seen in these teeth in 70% of all cases. In a retrospective study by Reiter et al. (9), maxillary 3rd premolars (107, 207) and mandibular 4th premolars (308, 408) were reported to be the most commonly affected teeth and it was emphasized that TR in premolars and molars was more common in older cats. Pistor et al. (29) reported that mandibular 1st molars (309, 409) and maxillary premolars (107, 108, 207, 208) were the teeth most frequently affected by TR. These findings are in agreement with the study by Whyte et al. (26), who reported that TR was most commonly detected in mandibular third premolars (307, 407) and mandibular first molars (309, 409). In addition, Whyte et al. (25) reported that mandibular 3rd premolars (307, 407) and mandibular 1st molars (309) were the teeth at highest risk for TR. In our study, mandibular third premolars (307, 407) and mandibular first molars (309, 409) were the teeth most frequently affected by TR. These findings are consistent with the results reported by Lang et al. (30) regarding the distribution of TR lesions. In particular, mandibular premolars and molars were more frequently affected in terms of TR, supporting the hypothesis that mechanical stress may be higher due to the location and anatomical features of these teeth. These results provide important contributions to understanding the anatomical distribution of TR in cats and emphasize the need for closer examination of specific teeth in the diagnostic process. Future studies may further investigate the environmental and genetic factors affecting the prevalence of TR in these teeth and develop more effective strategies to maintain dental health.

Statistical analyses performed to evaluate the relationship between TR stage and TR type in teeth diagnosed with tooth resorption revealed significant results. The classification system created by AVDC divides TR lesions into two main categories according to anatomical stages and radiographic examination images. This classification provides an important guide for the diagnosis and management of TR in clinical practice (1). Whyte et al. (25) evaluated the relationship between TR stage and TR type and found a statistically significant correlation between these two variables. In our study, when the number of teeth with TR was taken into consideration, it was determined that there was a significant relationship between TR stage and TR type. Our analysis shows that TR Type 1 is more common in teeth in Stages 1 and 2; 50% and 28.5% of these teeth were classified as TR Type 1, respectively. In contrast, TR Type 3 was predominant in Stages 3, 4 and 5. 28.5% of the teeth in Stage 3, 60-100% of the teeth in Stage 4 (4a, 4b, 4c) and 100% of the teeth in Stage 5 were identified as TR Type 3. These findings are consistent with the model proposed by DuPont (31), which explains the progression of TR. These results provide important information about the progression of TR. The findings show that

Type 1 lesions are more common in the initial stages of TR, but as the disease progresses, Type 3 lesions become predominant. This provides valuable data for understanding how anatomical and pathologic changes occur in the progression of TR. Furthermore, these findings may contribute to the development of more targeted treatment strategies by identifying the stage and type in the clinical management of TR.

This study's analysis of blood parameters in cats diagnosed with TR suggests that values outside the reference ranges may be associated with the systemic effects of TR. The elevation of WBC levels beyond the upper limit of the reference range indicates a possible relationship between TR, periodontal inflammation, and systemic inflammatory response (9). In this study, it can be inferred that inflammatory processes were active in cats with elevated WBC levels. Among the electrolyte parameters, Na levels were found to be above the reference range in some cats, with particularly high values of 163 and 167, which were considered indicators of systemic electrolyte imbalances due to cellular and tissue damage (4). Ca levels were also found to be low in several cats, with the lowest recorded value being 0.72. This finding supports the idea of mineral loss in teeth and bone resorption (23). Notably, low calcium levels emphasize the importance of calcium metabolism in the pathogenesis of TR. Low HB levels were also observed, with the lowest recorded HB value being 5.1, suggesting the presence of mild anemia, which could result from chronic inflammation (28). In some cases where glucose levels exceeded 120, transient hyperglycemia was thought to be related to stress or chronic inflammation. Furthermore, decreases in blood pH levels indicate the onset of acidosis. In our study, the pH dropping as low as 7.15 suggests that tooth resorption may disrupt metabolic balance (21). These findings suggest that TR is not confined to local periodontal tissues but has systemic metabolic and hematological effects. They provide important insights into the pathophysiology and progression of TR. This underscores the necessity for TR management and treatment to involve not only local dental interventions but also a holistic approach addressing overall systemic health.

This study presents a comprehensive approach to evaluate factors associated with the etiology and clinical, hematologic and radiographic findings of tooth resorption in cats. A multidisciplinary approach is required for early diagnosis, prevention of progression and effective treatment planning of TR. In future studies, a more detailed examination of environmental and metabolic factors in addition to genetic analysis will contribute to the development of new strategies for the management of the disease.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Research Assistant Hilmiçan Ergin and Dr. Veterinarian Fatma Çuhadar Erdal for their support during the study.

FINANCIAL SUPPORT

This research is part of a project funded under TÜBİTAK 2209-A programs (Project No. 1919B012203676).

CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest to be declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KP, concept and design.

SP, data collection and analysis.

ETHICAL STATEMENT

This study was carried out with the decision of the Ethics Committee of Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Experimental Animal Production and Research Center dated 01.12.2022 and numbered 2022/135.

REFERENCES

1. **American College of Veterinary Dentistry AVDC nomenclature committee.** Available online: <https://avdc.org/avdc-nomenclature/> (accessed on 23.06.2022).
2. **Lommer MJ, Verstraete FJ (2000).** Prevalence of odontoclastic resorption lesions and periapical radiographic lucencies in cats: 265 cases (1995-1998). *J Am Vet Med Assoc.*, 217(12):1866-1869.
3. **Reiter AM, Mendoza KA (2002).** Feline odontoclastic resorptive lesions: an unsolved enigma in veterinary dentistry. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 32(4):791-837.
4. **Gorrel C (2015).** Tooth resorption in cats: pathophysiology and treatment options. *J Feline Med Surg.*, 17(1):37-43.
5. **Imgham K, Gorrel C, Blackburn J, Farnsworth W (2001).** Prevalence of odontoclastic resorptive lesions in a population of clinical healthy cats. *J Small Anim Pract.*, 42:439-443.
6. **Bellows J (2019).** Oral anatomy for the general practitioner In: Small Animal Dental Equipment, Materials, and Techniques. Bellows J (ed). 2nd ed. John Wiley & Sons., Hoboken, USA., 87-112.
7. **Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S (1989).** Dynamics of dento alveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol.*, 5: 163-175.
8. **Harvey CE, Emily PP, (1993).** Restorative Dentistry. In: Small Animal Dentistry Harvey CE, (ed). Mosby-Year Book, St. Louis, MO, USA., 217-225.
9. **Reiter AM, Lewis JR, Okuda A (2005).** Update on the etiology of tooth resorption in domestic cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 35:913-942.
10. **Gorrel C, Larsson Å (2002).** Feline odontoclastic resorptive lesions: unveiling the early lesion. *J Small Anim Pract.*, 43(11):482-488.
11. **Harvey CE, Orsini P, McLahan C, Schuster C (2004).** Mapping of the radiographic central point of feline dental resorptive lesions. *J Vet Dent.*, 21(1):15-21.
12. **Hofmann-Lehmann R, Berger M, Sigrist B, Schawalder P, Lutz H (1998).** Feline immunodeficiency virus (FIV) infection leads to increased incidence of feline odontoclastic resorptive lesions (FOLR). *Vet Immunol Immunopathol.*, 65:299-309.
13. **Arx von T, Schawalder P, Ackermann M, Bosshardt DD (2009).** Human and feline invasive cervical resorptions: the missing link? Presentation of four cases. *J Endodon.*, 35:904-913.
14. **Thomas S, Lappin DF, Spears J, Bennett D, Nile C, Riggio MP (2017).** Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. *Res Vet Sci.*, 111:124-126.

15. **Scarlett JM, Saidla J, Hess J (1999).** Risk factors for odontoclastic resorptive lesions in cats. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 35(3):188-192.
16. **Booij-Vrieling HE, Ferbus D, Tryfonidou MA et al (2010).** Increased vitamin D-driven signalling and expression of the vitamin D receptor, MSX2, and RANKL in tooth resorption in cats. *Eur J Oral Sci.*, 118(1):39-46.
17. **Niemiec BA (2014).** Feline dental radiography and radiology: A primer. *J Feline Med Surg.*, 16:887-899.
18. **Woodward TM (2009).** Interpretation of dental radiographs. *Top Companion Anim Med.*, 24:37-43.
19. **Niemiec BA (2010).** Dental radiology. In: Small Animal Dental, Oral and Maxillofacial Disease: A Color Handbook. Niemec (ed). 1st ed. Momson Publishing London, England., 63-87.
20. **Eriksson J, Denwood M, Nielsen SS et al (2024).** Accuracy of three diagnostic tests to detect tooth resorption in unowned unsocialised cats in Denmark. *J Small Anim Pract.*, 65:387-393.
21. **Bellows J (2022).** Feline Dentistry. 2nd ed., John Wiley & Sons., Florida, USA.
22. **Pettersson A, Mannerfelt T (2003).** Prevalence of dental resorptive lesions in Swedish cats. *J Vet Dent.*, 20:140-142.
23. **DeLaurier A, Boyde A, Jackson B, Horton MA, Price JS (2009).** Identifying early osteoclastic resorptive lesions in feline teeth: a model for understanding the origin of multiple idiopathic root resorption. *J Periodontal Res.*, 44:248-257.
24. **O'Neill DG, Gunn-Moore D, Sorrell S et al (2023).** Commonly diagnosed disorders in domestic cats in the UK and their associations with sex and age. *J Feline Med Surg.*, 25(2):1-9.
25. **Whyte A, Tejedor MT, Whyte J, Monteagudo LV, Bonastre C (2021).** Blood parameters and feline tooth resorption: a retrospective case control study from a Spanish University Hospital. *Animals*, 11:2125.
26. **Whyte A, Lacasta S, Whyte J, Monteagudo LV, Tejedor MT (2020).** Tooth resorption in Spanish domestic cats: Preliminary data. *Top Companion Anim Med.*, 38:100369.
27. **Girard N, Servet E, Biourge V, Hennet P (2008).** Feline tooth resorption in a colony of 109 cats. *J Vet Dent.*, 25:166-174.
28. **DuPont G (1995).** Crown amputation with intentional root retention for advanced feline resorptive lesions-a clinical study. *J Vet Dent.*, 12(1):9-13.
29. **Pistor P, Janus I, Janeczek M, Dobrzyński M (2023).** Feline Tooth Resorption: A description of the severity of the disease in regard to animal's age, sex, breed and clinical presentation. *Animals*, 13:2500.
30. **Lang LG, Wilkinson TE, White TL, Farnsworth RK, Potter KA (2016).** Computed tomography of tooth resorption in cats. *Vet Radiol Ultrasound.*, 57:467-474.
31. **DuPont GA (2005).** Radiographic evaluation and treatment of feline dental resorptive lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 35:943-962.

Evaluation of the Effectiveness of Tarantula Cubensis Extract in Cats Diagnosed with Stomatitis

Faruk TÜRKARSLAN^{1,a}, Murat TANRISEVER^{1,b,✉}, Emine ÜNSALDI^{1,c}

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Fırat University, Elazığ, TÜRKİYE

ORCID: ^a0009-0001-9982-897x, ^b0000-0003-3815-8543, ^c0000-0003-1320-0709

✉ Corresponding Author

Murat TANRISEVER

Department of Surgery, Faculty of
Veterinary Medicine, Fırat University,
Elazığ, TÜRKİYE

mtanrisever@firat.edu.tr

Received
05.02.2025

Accepted
19.03.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1633969

How to cite: Türkarslan F, Tanrisever M, Ünsaldı E (2025). Evaluation of the effectiveness of tarantula cubensis extract in cats diagnosed with stomatitis. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):13-18.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

Stomatitis in cats is an immune response to antigenic stimuli, exacerbated by viral infections. The etiopathogenesis of this disease, which manifests itself with sores in the mouth, has not been fully clarified. Today, in addition to medical treatment, partial or complete molar extractions are also performed. In this study, the results of using tarantula cubensis extract in addition to antibiotic treatment in the treatment of cats diagnosed with stomatitis at the Fırat University Animal Hospital Small Animal Surgery Clinic in Elazığ and the Hekimköy Veterinary Clinic in Adana were investigated. The cats were evaluated in two groups. The cats in the first group (ANT) ($n=10$) received amoxicillin clavulanic acid treatment, and the cats in the second group (EXT) ($n=10$) received tarantula cubensis extract injections in addition to the same antibiotic treatment. The response to the treatments was evaluated by 3 different surgeons, one week apart, by macroscopic inspection and scored between 1 and 4. The obtained data were statistically evaluated with the Mann Whitney U test and Wilcoxon tests. In this study, a statistically significant improvement was observed in cats treated with tarantula cubensis extract in addition to antibiotic treatment compared to cats treated with antibiotics alone.

Key Words: Cat, stomatitis, tarantula cubensis extract

Stomatitis Tanısı Konan Kedilerde Tarantula Cubensis Ekstraktının Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Öz

Kedilerde stomatitis antijenik uyarılara karşı, viral enfeksiyonlar ile şiddetlenen, bağışıklık sisteminin verdiği bir tepkidir. Ağız içerisinde çıkan yaralarla kendini gösteren bu hastalığın etiopatogenezisi tam olarak netlik kazanmamıştır. Günümüzde medikal tedavi yanı sıra kısmi veya tüm azı dişlerin çekimi de yapılmaktadır. Bu çalışmada, Elazığ'da Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Küçük Hayvan Cerrahi Kliniği'ne ve Adana'da Hekimköy Veteriner Kliniği'nde stomatitis tanısı konulan kedilerin tedavisinde antibiyotik tedavisine ek olarak tarantula cubensis ekstraktının kullanımının sonuçları araştırıldı. Kediler iki grup halinde değerlendirmeye alındı. Birinci gruptaki (ANT) kedilere ($n=10$) amoksisilin klavulanik asit tedavi yapıldı, ikinci gruptaki (EXT) kedilere ($n=10$) ise aynı antibiyotik tedavisine ek olarak tarantula cubensis ekstraktı enjeksiyonları yapıldı. Tedavilere verilen yanıt 3 ayrı cerrah tarafından, birer hafta arayla makroskopik yönden inspeksiyon ile değerlendirilerek ve 1 ile 4 arasında skorlandı. Elde edilen veriler istatistiksel açıdan Mann Whitney U testi ve Wilcoxon testleri ile değerlendirildi. Yapılan bu çalışmada antibiyotik tedavisine ek olarak tarantula cubensis ekstraktı ile tedavi edilen kedilerde, tek başına antibiyotik tedavisi yapılan kedilere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Kedi, stomatitis, tarantula cubensis ekstraktı

INTRODUCTION

Stomatitis in cats is a syndrome characterized by proliferative and ulcerative chronic inflammation of the soft tissues of the oral cavity (1). This syndrome is known by various names in the literature such as plasma cell stomatitis-pharyngitis (2), chronic gingivitis and pharyngitis (3), lymphocytic plasmacytic gingivitis-stomatitis (4), plasmacytic stomatitis-pharyngitis (5) and chronic stomatitis (6). It is a significant disease that causes pain in the oral cavity of cats and can be serious enough to lead to euthanasia of affected cats. The two main areas most difficult to treat are the tissue lateral to the palatoglossal folds and the mucosa covering the premolar/molar area extending into the buccal mucosa (7,8). It can also affect the pharynx, tongue and lips. Palatal inflammation can also be seen and periodontal lesions are often detected (9). Viruses associated with feline stomatitis include FIV, FHV-1, FCV and FeLV. Since the disease is very contagious, having many cats living in the same environment increases the risk factor considerably.

In cats with stomatitis, there are generally two treatment modalities: medical and surgical. Medical treatment alone usually does not yield positive results in the long term and may require surgical intervention; the current standard treatment method is tooth extraction. Regardless of the method, all treatment options require adequate pain management. Studies have shown that the extraction of some teeth (all premolars and molars) or the entire tooth gives good results in the long term (9-11). In the studies mentioned above, it was reported that approximately 70-80% of cats with stomatitis showed significant improvement, while approximately 20-30% of cats showed little or no improvement. Things you can do at home to treat this disease include brushing your cat's teeth or using oral antiseptics containing chlorhexidine (12,13). The goal of treatment for feline stomatitis has been to suppress the immune system because this disease is an immune-mediated inflammatory disease (14). In cases of feline stomatitis, antibiotic treatment alone provides only temporary relief (13,15). Commonly recommended antibiotics include amoxicillin/clavulanic acid, metronidazole, clindamycin, and doxycycline. Antibiotic treatment is recommended, which can last from a week to months, and sometimes it can be combined with topical treatment (12-15).

Corticosteroids are used in feline cases of stomatitis due to their immunosuppressive and anti-inflammatory effects (7,15,16). Azathioprine, chlorambucil and cyclophosphamide are other immunosuppressive drugs used (16,17). Additionally, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are often recommended along with antibiotic treatment in cats with stomatitis (7,18). The purpose of this study was to investigate the effectiveness of tarantula cubensis extract, which can be used in addition to antibiotic treatment in cats with stomatitis.

MATERIAL AND METHODS

The material of this study consisted of cats with stomatitis that were brought to Firat University Animal Hospital Small Animal Surgery Clinic in Elazığ and Hekimköy Veterinary Clinic in Adana with the complaint of sores in the mouth. Cats

of different species, breeds, sex, age and weight were brought to the clinic and treatment was started without any selection. These cats with stomatitis brought to the clinic were evaluated for renal failure and such cats with stomatitis were excluded from the study. In addition, overweight obese cats and underweight cats were also excluded from the study. In cats with stomatitis brought to the clinic, the mouth area was firstly antisepticized. During the treatment period, cats in the first group (antibiotic group $n=10$) (ANT) received routine antibiotic treatment with amoxicillin/clavulanic acid, 8.75 mg/kg intramuscularly (Synulox, 140 mg amoxicillin trihydrate and 35 mg clavulanic acid, Haupth Farma, Italy) for 10 days. In the second group (extract group $n=10$) (EXT), in addition to the same dose of antibiotic, subcutaneous tarantula cubensis extract (tarantulacubensis D6 1ml in 1ml) (Theranekron D6, Richter Pharma, Austria) 0.5-1ml was administered subcutaneously 2-3 times at 1 week intervals. In addition, a mouth spray (Klorhex Plus, Drogosan, Turkey) containing 0.075 g flurbiprofen and 0.036 g chlorhexidine digluconate was used as oral antiseptic for all cats. For the ANT group, antibiotics were administered for 1 week, followed by a 1-week break, and then continued again for 1 week with a daily dose, while the patient owners were instructed to use the mouth sprays regularly in both groups. During this treatment period, intraoral photographs were taken regularly for later evaluation. Healing rates were evaluated macroscopically by 3 different surgeons at one week intervals and scored between 1 and 4. These values were transferred to a table and evaluated statistically.

Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics 22 program was used in the statistical analysis of the study. The normality of the parameters was determined by the Shapiro-Wilk test and it was understood that they did not show a normal distribution. The Mann-Whitney U test was used to compare quantitative data between two groups.

The Friedman test (post hoc Wilcoxon signed-rank test) was used to evaluate within-group changes. Statistical significance was considered at the $P<0.05$ level.

RESULTS

Cats with stomatitis brought to the clinic with the complaint of wounds in the mouth area were evaluated in two separate groups, while the cat owners in both groups were told to bring their cats to the clinic for examination and further treatment at one-week intervals. All patient owners were given the necessary information about the treatment process; antibiotic administration, use of oral antiseptics and nutrition with soft foods. In addition, for cats to be treated with tarantula cubensis extract, their owners were informed in detail about the subject and this extract was applied only in the clinic. Cats with an average body weight of 3-4 kg were included in the study. At the end of the study, the pictures obtained on the 1st, 7th, 14th and 28th days were subjected to macroscopic evaluation by three different surgeons without knowing which group they belonged to (Figure 1-5).



Figure 1. Lesions extending around the mouth of cat number 1 belonging to ANT group (7th day)



Figure 2. Regression of stomatitis-related lesions in cat number 1 of ANT group (day 21)

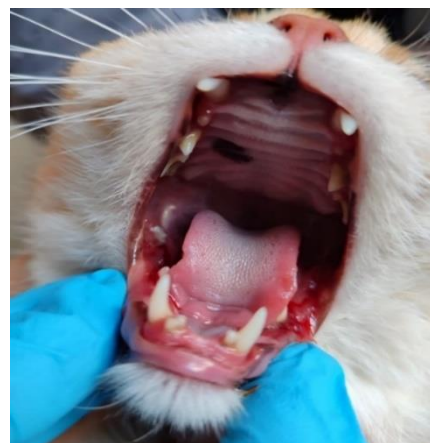


Figure 3. Appearance of intraoral lesions in cat number 4 belonging to the EXT group (7th day)

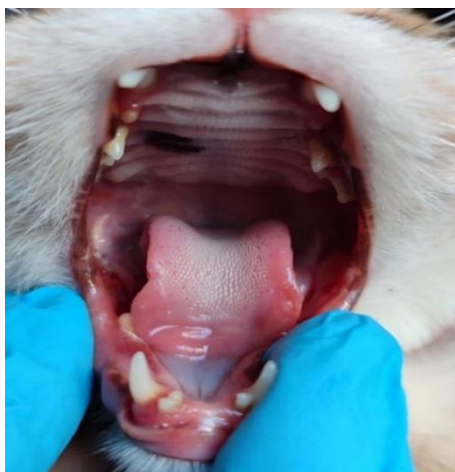


Figure 4. Improvement in the intraoral lesions of cat number 4 belonging to the EXT group (28th day)



Figure 5. Healing status of cat no. 5 in ANT group between day 1 and day 28

The assessments were scored, with 1 being the worst and 4 being the best, and then averaged. The values obtained were recorded in a table (Table 1, Table 2, Table 3). It was evaluated that there was no visible improvement in the first two weeks in both groups (Figure 1, Figure 3). Differences between the groups in terms of Healing Scores were given in Table 4.

Table 1. Healing rates of ANT group cats (1 represents the worst healing, 4 represents the best healing)

Cat No	1st day	7th day	14th day	28th day
Cat 1	1	1	2	3
Cat 2	1	1	2	2
Cat 3	1	2	3	3
Cat 4	1	1	2	2
Cat 5	1	1	3	4
Cat 6	1	1	2	3
Cat 7	1	1	2	2
Cat 8	1	2	2	2
Cat 9	1	1	2	2
Cat 10	1	1	2	2

Table 2. Healing rates of EXT group cats (1 represents the worst healing, 4 represents the best healing)

Cat No	1st day	7th day	14th day	28th day
Cat 1	1	2	2	3
Cat 2	1	1	2	3
Cat 3	1	2	3	3
Cat 4	1	2	2	3
Cat 5	1	2	3	3
Cat 6	1	1	2	3
Cat 7	1	2	3	4
Cat 8	1	1	2	3
Cat 9	1	1	2	2
Cat 10	1	2	3	4

Table 3. Table containing the mean values of the groups (1 indicates the worst healing; 4 indicates the best healing)

Group	1st day	7th day	14th day	28th day
ANT group	1.00	1.20	2.20	2.50
EXT group	1.00	1.50	2.40	3.10

Table 4. Evaluation of Healing Scores Between Groups

		1st day	7th day	14th day	28th day
ANT	Min-Max	1-1	1-2	2-3	2-4
	Mean $\pm$ SD (Median)	1 $\pm$ 0 (1)	1.2 $\pm$ 0.4 (1)	2.2 $\pm$ 0.4 (2)	2.5 $\pm$ 0.7 (2)
EXT	Min-Max	1-1	1-2	2-3	2-4
	Mean $\pm$ SD (Median)	1 $\pm$ 0 (1)	1.6 $\pm$ 0.5 (2)	2.4 $\pm$ 0.5 (2)	3.1 $\pm$ 0.6 (3)
	P	1.000	0.075	0.342	0.042*

Mann Whitney U test *P<0.05

There was no statistically significant difference between the groups in terms of day 1, day 7 and day 14 healing levels (P>0.05). The 28th day healing score of the EXT

group was statistically significantly higher than the ANT group (P:0.042; P<0.05). (Table 5)

Table 5. Evaluation of intra-group healing scores

	ANT		EXT	
	Min-Max	Mean $\pm$ SD (Median)	Min-Max	Mean $\pm$ SD (Median)
Day 1	1-1	1 $\pm$ 0 (1)	1-1	1 $\pm$ 0 (1)
Day 2	1-2	1.2 $\pm$ 0.4 (1)	1-2	1.6 $\pm$ 0.5 (2)
Day 3	2-3	2.2 $\pm$ 0.4 (2)	2-3	2.4 $\pm$ 0.5 (2)
Day 4	2-4	2.5 $\pm$ 0.7 (2)	2-4	3.1 $\pm$ 0.6 (3)
¹ p		0.001*		0.001*
Day 1-Day 7 ²p		0.157		0.014*
Day 1-Day 14 ²p		0.003*		0.004*
Day 1-Day 28 ²p		0.004*		0.004*
Day 7-Day 14 ²p		0.004*		0.005*
Day 7-Day 28 ²p		0.006*		0.004*
Day 14-Day 28 ²p		0.083		0.008*

¹Friedman Test ²Wilcoxon sign test *P<0.05

In the ANT group, the changes observed in the healing scores across the days were statistically significant (P:0.001; P<0.05). No significant change was observed in the healing scores from day 1 to day 7 (P>0.05); however, the increases in healing scores from day 1 to day 14 and day 28 were statistically significant (P<0.05). The increases in healing scores from day 7 to day 14 and day 28 were statistically significant (P<0.05). No significant change was observed in the healing scores from day 14 to day 28 (P>0.05).

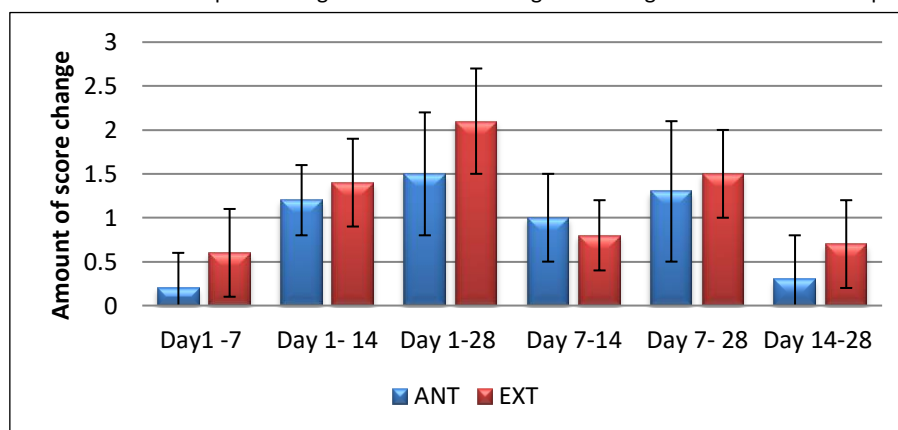
In the EXT group, the changes observed in the healing scores across the days were statistically significant (P:0.001; P<0.05). The increases in healing scores from day 1 to day 7, day 14, and day 28 were statistically significant (P<0.05). The increases in healing scores from day 7 to day 14 and day 28 were statistically significant (P<0.05). The increase in healing scores from day 14 to day 28 was statistically significant (P<0.05) (Table 6, Chart 1).

Table 6. Evaluation of the Changes in Healing Scores Between Groups

	ANT		EXT		
Changes	Min-Max	Mean $\pm$ SD (Median)	Min-Max	Mean $\pm$ SD (Median)	p
Day 1-7	0-1	0.2 $\pm$ 0.4 (0)	0-1	0.6 $\pm$ 0.5 (1)	0.075
Day 1-14	1-2	1.2 $\pm$ 0.4 (1)	1-2	1.4 $\pm$ 0.5 (1)	0.342
Day 1-28	1-3	1.5 $\pm$ 0.7 (1)	1-3	2.1 $\pm$ 0.6 (2)	0.042*
Day 7-14	0-2	1 $\pm$ 0.5 (1)	0-1	0.8 $\pm$ 0.4 (1)	0.329
Day 7-28	0-3	1.3 $\pm$ 0.8 (1)	1-2	1.5 $\pm$ 0.5 (1.5)	0.396
Day 14-28	0-1	0.3 $\pm$ 0.5 (0)	0-1	0.7 $\pm$ 0.5 (1)	0.081

Mann Whitney U test *P<0.05

Chart 1. Graph Showing the Amount of Change in Healing Scores Between Groups



There was no statistically significant difference in the amount of increase in healing scores on day 7 compared to day 1 between the groups ($P>0.05$). Similarly, there was no statistically significant difference in the amount of increase in healing scores on day 14 compared to day 1 between the groups ($P>0.05$). The increase in healing scores on Day 28 compared to Day 1 in the EXT group was statistically significantly higher than in the ANT group ($P:0.042$; $P<0.05$).

There was no statistically significant difference in the amount of increase in healing scores on day 14 compared to day 7 between the groups ($P>0.05$). Similarly, there was no statistically significant difference in the amount of increase in healing scores on day 28 compared to day 7 between the groups ($P>0.05$). There was no statistically significant difference in the amount of increase in healing scores on day 28 compared to day 14 between the groups ($P>0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Stomatitis in cats is unfortunately a serious and frustrating disease that is poorly defined in the literature. This disease not only causes pain and stress for the cat, but also creates a very worrying situation for cat owners due to inadequate response to various treatments. Studies have investigated the possible causes of stomatitis in cats; however, its exact etiopathogenesis remains unclear. The related pathogens include bacteria and viruses, but immune-related causes have also been proposed. In this study, the effectiveness of Tarantula cubensis extract in treatment, in addition to antibiotic therapy, was investigated.

Taskaya et al. (19), in a study they reported that there was no statistically significant difference between the two drug groups (amoxicillin 7 mg + clavulanic acid 1.75 mg, subcutaneously, mg/kg body weight or trimethoprim 4 mg + sulfadimethoxine 20 mg, subcutaneously, mg/kg body weight) used in the treatment of stomatitis in cats. In this study, amoxicillin-clavulanic acid treatment was applied to one group, while the other group received Tarantula cubensis extract in addition to this treatment protocol. The results showed that a statistically significant difference emerged between the groups in terms of treatment effectiveness.

Jennings et al. (11), in a retrospective case series involving 95 cats with stomatitis who were treated with full or partial tooth extractions along with concurrent medical management, reported that 28.4% of the cats experienced complete healing, 39% showed significant clinical healing, 26.3% had minimal healing, and 6.3% showed no healing. In

a more recent study by Druet and Hennet (10), 56 cats treated with tooth extraction were reported, with 51.8% of the cats achieving clinical improvement or significant improvement within an average of 38 days. Hennet *et al.* (7), in a study they conducted, reported that 23% of 11 cats treated with prednisone showed significant improvement, and 7% achieved clinical improvement.

Vercelli et al. (20), in their study, investigating the effectiveness of oral cyclosporine in 8 cats that had not previously been treated with tooth extractions, reported that 4 cats (50%) achieved clinical remission, and the remaining cats showed considerable improvement.

Lommer (21), shows that in his study, applied oral cyclosporine to 9 cats previously treated with extractions. He stated that after 6 weeks, there was a 77.8% healing in the treated cats and a 14.3% healing in the placebo group, which was statistically significant. Long-term observation was conducted on 11 cats, and it was reported that 5 of them (45.5%) showed clinical improvement after receiving cyclosporine for 3 months or longer.

Arzi et al. (22), in a study they conducted, treated 7 cats with autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. They reported a 71.4% positive response rate, with clinical remission observed in 42.8% of the cats. Additionally, they mentioned that 28.6% of the cats showed no significant improvement.

Albay et al. (23), in a study they conducted, evaluated the effectiveness of Tarantula cubensis extract (1:100/D2, Theranekron®, Richter Pharma, Austria) in treating oral lesions in bovine blue tongue disease. A total of 9 patients were treated, with 6 cattle receiving tetracycline, flunixin meglumine, and Tarantula cubensis extract (Theranekron), while the remaining 3 cattle were treated as controls with the same treatment regimen excluding Theranekron. Twenty-four hours later, the treatment group showed faster re-epithelialization and return to normal body temperature compared to the control group. In this study, the application of Tarantula cubensis extract in addition to antibiotic therapy in 10 out of 20 cats resulted in statistically significant healing. This study is in parallel with the current study.

In conclusion, it was determined that the application of Tarantula cubensis extract, in addition to current treatments, may be relatively effective in the regeneration of oral and surrounding wounds in the treatment of stomatitis, a chronic, non-healing disease in cats.

ACKNOWLEDGEMENT

This article has been produced from a master's thesis. We would like to thank everyone who contributed to the completion of this study.

FINANCIAL SUPPORT

No support was received from any organization in the conduct of this research.

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest to be declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MT, EÜ and FT took part in the planning of the study and the collection of sample images. Clinical studies were conducted by MT, EÜ and FT. The writing and final checks of the study were carried out with the contributions of all authors.

ETHICAL STATEMENT

This study was approved by Firat University (Protocol Number: 21564 and date: 17.01.2024) Local Animal Experiments Ethics Committee.

REFERENCES

1. Johnessee JS, Hurvitz AI (1983). Feline plasma cell gingivitis-pharyngitis, *JAAHA*, 19:179–181.
2. White SD, Rosychuk RA, Janik TA, Denerolle P, Schultheiss P (1992). Plasma cell stomatitis-pharyngitis in cats: 40 cases (1973-1991). *JAAHA*, 200(9):1377-1380.
3. Thompson RR, Wilcox GE, Clark WT, Jansen KL (1984). Association of calicivirus infection with chronic gingivitis and pharyngitis in cats. *JSAP*, 25:207-210.
4. Lommer MJ, Verstraete FJ (2003). Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiol Immunol*, 18(2):131-134.
5. Reindel JF, Trapp AL, Armstrong PJ, Stickle RL (1987). Recurrent plasmacytic stomatitis-pharyngitis in a cat with esophagitis, fibrosing gastritis, and gastric nematodiasis. *JAVMA*, 190(1):65-67.
6. Gaskell RM, Gruffydd Jones T (1977). Intractable feline stomatitis. *Veterinary Annual*, 17:195-199.
7. Hennet PR, Camy GA, McGahie DM, Albouy MV (2011). Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: a randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *J Feline Med Surg*, 13(8):577–587.
8. Southerden P (2010). Review of feline oral disease. *In Practice*, 32(2):51.
9. Hennet PR (1997). Chronic gingivo-stomatitis in cats: long-term follow-up of 30 cases treated by dental extractions. *J. Vet. Dent.*, 14:15-21.
10. Druet I, Hennet P (2017). Relationship between Feline calicivirus Load, Oral Lesions, and Outcome in Feline Chronic Gingivostomatitis (Caudal Stomatitis): Retrospective Study in 104 Cats. *Front. Vet. Sci.*, 4:209.
11. Jennings MW, Lewis JR, Soltero-Rivera MM, Brown DC, Reiter AM (2015). Effect of tooth extraction on stomatitis in cats: 95 cases (2000-2013). *JAAHA*, 246(6):654-660.
12. DeForge DH (2004). Images in veterinary dental practice. Ulcerative lymphoplasmacytic stomatitis syndrome. *J Am Vet Med Assoc*, 224:207-208.
13. Harvey CE (1991). Oral inflammatory diseases in cats. *JAVMA*, 27:585-591.
14. Winer JN, Arzi B, Verstraete FJ (2016). Therapeutic Management of Feline Chronic Gingivostomatitis: A Systematic Review of the Literature. *Front Vet Sci*, 3:54.
15. Lyon KF (2005). Gingivostomatitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 35(4):891–911.
16. Wiggs RB (2007). Lymphocytic Plasmacytic Stomatitis. In: The Feline Patient. Norsworthy GD. (Ed.) Third ed. Iowa, Blackwell.
17. Diehl K, Rosychuk RA (1993). Feline gingivitis-stomatitis-pharyngitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 23(1):139-153.
18. Mihaljevic SY (2003). First clinical experiences with omega-interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-opharyngitis of cats. *Praktische Tierarzt*, 84:350-361.
19. Taşkaya Ş, Demirkan İ, Çevik Demirkan A, Korkmaz M (2013). Kedi Gingivitis Sağaltımında Amoksisilin – Klavulanik Asit ve Sulfadimetilprimidin – Trimetoprim Ajanlarının Klinik Etkilerinin Karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 8(3):216-223.
20. Vercelli A, Raviri G, Cornegliani L (2006). The use of oral cyclosporin to treat feline dermatoses: a retrospective analysis of 23 cases. *Vet Dermatol*, 17(3):201-216.
21. Lommer MJ (2013). Efficacy of cyclosporine for chronic, refractory stomatitis in cats: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *J Vet Dent*, 30(1):8-17.
22. Arzi B, Clark KC, Sundaram A, et al. (2017). Therapeutic efficacy of fresh, allogeneic mesenchymal stem cells for severe refractory feline chronic gingivostomatitis. *Stem Cells Transl Med*, 6(8):1710-1722.
23. Albay MK, Şahinduran Ş, Kale M, Karakurum MÇ, Sezer K (2009). Influence of Tarantula cubensis Extract on the Treatment of the Oral Lesions in Cattle with Bluetongue Disease. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (4):593-596.

Siirt-Colored Mohair Goat (*Capra Hircus*) and Romanov Sheep (*Ovis Aries*) Determination of Morphometric Features of Hyoid Bone via Three Dimensional Modelling

Muhammed Zahid ATLI^{1,a,✉}, Fatma İŞBİLİR^{1,b}, Barış Can GÜZEL^{1,c}

¹Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Siirt University, Siirt, TÜRKİYE.

ORCID: ^a0009-0007-3139-1453, ^b0000-0002-6110-1302, ^c0000-0002-2504-120X

✉ Corresponding Author

Muhammed Zahid ATLI

Department of Anatomy, Faculty of
Veterinary Medicine, Siirt University,
Siirt, TÜRKİYE

mzahid.atli@siirt.edu.tr

Received
20.09.2024

Accepted
20.03.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1553193

How to cite: Atli MZ, İşbilir F, Güzel BC (2025). Siirt-Colored mohair goat (*Capra Hircus*) and romanov sheep (*Ovis Aries*) determination of morphometric features of hyoid bone via three dimensional modelling. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):19-22.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).



Abstract

The hyoid bone is the only bone that connects caudally to the tympanohyoid and stylohyoid processes of the pars petrosa of the temporal bone and does not articulate with any other bone. The hyoid bone plays a crucial role in maintaining the balance and functionality of the respiratory tract, as well as in language functions and swallowing. Morphometric studies on the hyoid bone have been conducted in both humans and animals. With advancements in technology, two-dimensional (2D) structures have been replaced by three-dimensional (3D) modeling. Our study is the first to determine the morphometric properties of the hyoid bone in sheep and goats using the 3D modeling method. For this purpose, 40 hyoid bone models from adult Siirt-colored mohair goats (10 females, 10 males) and Romanov sheep (10 females, 10 males) were utilized. All 40 bones were modeled, and measurements were obtained from the models. Skull sections were taken with a computed tomography device and recorded in DICOM format. The images were transferred to the 3D-Slicer (5.2) software program and 3D models were made. Five morphometric parameters were measured simultaneously for two animal species from these models. Measurement results were evaluated statistically between male and female animals. The correlation between measurement parameters was determined by correlation analysis. As a result of the study, the stylohyal length (SL) measurement parameter had a statistical difference between genders in both sheep and goats. Additionally, it was determined that the epihyal length (EL) value showed a significant difference between male and female goats in Siirt-colored mohair goats. When the correlation analysis table was examined, it was determined that the SL parameter had a positive correlation with CL and TL, and the TL parameter had a positive correlation with CL and BL in the two animal species. We believe that the differences in the hyoid bone of these two races, which are in the Ruminantia subgroup and have different phenotypes, will contribute to the literature. In addition, the data will serve as a reference for relevant studies in the fields of veterinary medicine, anatomy education, surgery, pathology, and zoo-archaeology.

Key Words: Hyoid bone, morphometry, romanov sheep, siirt-colored mohair goats, 3D modelling

Siirt Renkli Tiftik Keçisi (*Capra hircus*) ve Romanov Koyunu (*Ovis aries*) Dil Kemisinin Morfometrik Özelliklerinin 3D Modelleme Aracılığıyla Belirlenmesi

Öz

Hiyoid kemik, kaudal olarak temporal kemiğin pars petrosa bölümündeki timpanohiyoid ve stilohiyoid çıkıntılarına bağlanan ve başka hiçbir kemikle eklem yapmayan tek kemiktir. Hiyoid kemik, solunum yolunun dengesi ve işlevselliğinin korunmasının yanı sıra dil fonksiyonları ve yutma işlemlerinde de hayati bir rol oynar. Hiyoid kemiği üzerine morfometrik çalışmalar hem insanlarda hem de hayvanlarda gerçekleştirilmiştir. Teknolojideki ilerlemelerle birlikte, iki boyutlu (2B) yapılar yerini üç boyutlu (3B) modellemeye bırakmıştır. Çalışmamız, koyun ve keçilerde hiyoid kemiğin morfometrik özelliklerini 3B modelleme yöntemiyle belirleyen ilk araştırmadır. Bu amaçla, yetişkin Siirt renkli tiftik keçisi (10 dişi, 10 erkek) ve Romanov koyunu (10 dişi, 10 erkek) olmak üzere toplam 40 hiyoid kemik modeli kullanılmıştır. Tüm kemikler 3B olarak modellenmiş ve bu modeller üzerinden ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kafatası kesitleri, bilgisayarlı tomografi cihazı ile alınarak DICOM formatında kaydedilmiş ve görüntüler 3D-Slicer (5.2) yazılımına aktarılarak 3B modeller oluşturulmuştur. Her iki hayvan türü için bu modellerden beş morfometrik parametre eş zamanlı olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları, erkek ve dişi hayvanlar arasında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ölçüm parametreleri arasındaki ilişki ise korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, stilohiyal uzunluğu (SL) ölçüm parametresinin hem koyun hem de keçilerde cinsiyetler arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, epihyal uzunluğu (EL) değerinin, Siirt renkli tiftik keçilerinde erkek ve dişi bireyler arasında anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Korelasyon analizi tablosu incelendiğinde, SL parametresinin CL ve TL ile pozitif korelasyon gösterdiği, TL parametresinin ise CL ve BL ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ruminantia alt grubunda yer alan ve farklı fenotiplere sahip bu iki ırkın hiyoid kemiğindeki farklılıkların literatüre katkı sağlayacağına inanıyoruz. Ayrıca, elde edilen veriler veteriner hekimlik, anatomi eğitimi, cerrahi, patoloji ve zoo-arkoloji alanlarındaki ilgili çalışmalara referans oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Dil kemiği, morfometri, romanov koyunu, siirt renkli tiftik keçisi, 3D modelleme

INTRODUCTION

The majority of colored mohair goats in Turkey are raised in the provinces of Siirt, Batman, and Şırnak. Romanov sheep are another breed grown in the Eastern Anatolia Region, and the purpose of breeding these two breeds in this region is to know that these animals have important characteristics (1). The Romanov sheep is known for its high fertility and characteristic hairy skin features. It is characterized by a short head, legs, and tail structure, as well as a black-gray body color (2,3). The Siirt-colored mohair goat is a breed particularly used for mohair production in the region. The mohair obtained from these goats is used in the production of Siirt blankets, which are popular as tourist souvenirs. Male goats have longer horns, and their ears are more drooping compared to female goats. Their coats are generally black, white, brown, yellow, and red (4). Morphometric differences observed on the skull have been frequently used in recent years for breed and gender differentiation. The usability of the hyoid bone alone in such differentiation remains a topic of interest.

The hyoid bone exhibits different articulation characteristics depending on the animal species. In cats and dogs, it connects to the processus mastoideus of the os temporale, while in equines and ruminants, it attaches to the processus styloideus of the os temporale. Additionally, in pigs, the hyoid bone articulates with the region of the os occipitale known as the processus jugularis (5).

Hyoid bone plays an important role in the balance and adequacy of the respiratory tract, language function, and swallowing (6). In addition, this bone structure has an important role in the clinic. One study found differences in the position of the hyoid bone in jaw dysplasia (7). Os hyoideum is related to swallowing and tongue physiology, therefore any disorder in this structure will negatively affect functions such as swallowing (8). The morphology of this bone varies according to age and gender, so it can also be used in age and gender determinations. Sex differences in the hyoid bone were identified through radiographic measurements and morphometric analyses. Males showed significantly larger dimensions compared to females, including the width and breadth of the body, as well as the length and breadth of the greater cornu. The anterior and posterior ends of the greater cornu were also significantly wider in males. These differences are likely associated with the generally larger skeletal and muscular structure in males (9).

In anatomy education, which has an important place in medicine and veterinary medicine, practical education is more important than theoretical, therefore the use of 3D modeling is increasing significantly. The biggest advantage of 3D modeling in anatomy education is that the material preserves its structure and shape (10). 3D modeling allows multiple production of dissected material at any size scale to produce anatomically accurate reproductions (11). One of the significant advantages of modeling is making deformed or more fragile bone specimens more durable (10). With the 3D modeling of the hyoid bone, its use as an educational material for different animal species is expected to increase. There are 3D morphometric studies of different animal species in the literature (12-14). Detailed description of the

morphological characteristics of Siirt-colored mohair goats is unclear due to insufficient research.

This study aims to obtain morphometric measurement values by three-dimensional modeling of the hyoid bone in Siirt-colored mohair goats and Romanov sheep using computerized tomography and to reveal the biometric differences of these measurement values according to gender and other breeds. In addition, the data obtained will serve as a resource for anatomy literature and taxonomy.

MATERIAL AND METHODS

In our study, 40 hyoid bone models of adults (1-3 years old); Siirt-colored mohair goats (10 females and 10 males) and Romanov sheep (10 females and 10 males) were used. No clinical findings were observed in the skulls used in the study. The materials used in the study were collected from slaughterhouses in Siirt and Diyarbakır province. The measurement parameters of the hyoid bone are shown in Figure 1. Skulls of sheep and goats were scanned at Siirt University Faculty of Medicine Hospital, Department of Radiology, with a 64-detector multi-slice computed tomography device at 80 kV, 200 MA, 639 mGY, with a section thickness of 0.625 mm. The resulting images were saved in DICOM format. The images were then transferred to 3D-Slicer (5.2) software programs to create three-dimensional models. IBM SPSS Statistics 23 package program was used for statistical measurements. Independent Samples t test was used to compare measurements between genders. Pearson correlation analysis was used to reveal the correlation between measurements.

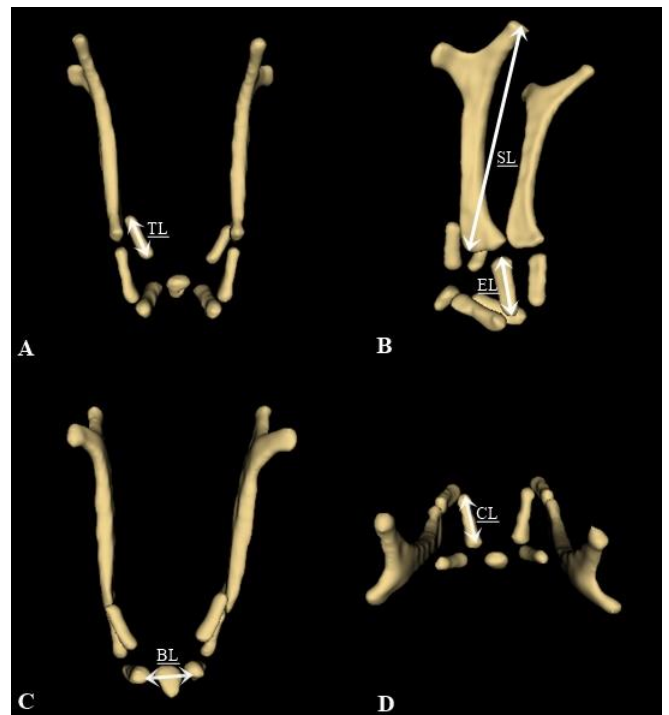


Figure 1. A. Cranial view of the Romanov sheep, B. Lateral view of the Romanov sheep, C. Caudal view of the Mohair goat, D. Dorsal view of the Mohair goat

Morphometric measurement points of hyoid bone of Romanov sheep and Siirt-colored mohair goat. SL: Stylohyal lenght, EL: Epihyal lenght, CL: Ceratohyal lenght, TL: Tyhrohyal lenght, BL: Basihyal lenght

RESULTS

In our study, the independent Samples t test and correlation analysis results of the hyoid bones of the Siirt-colored mohair goat and the Romanov sheep are shown in Tables 1, 2, and 3. SL and EL parameters were found to be statistically significant between sexes in Siirt-colored mohair goats ($P<0.01$). It was determined that other measurement parameters did not have a statistically meaningful difference ($P>0.05$). In Romanov sheep, the SL measurement parameter had a statistically significant difference between male and female animals ($P<0.05$). No statistically significant difference was determined in other measurement parameters ($P>0.05$). When the correlation analysis table was examined, it was determined that the SL parameter had a positive correlation with CL and TL, and the TL parameter had a positive correlation with CL and BL in the two animal species.

Table 1. Statistical analysis of hyoid bone of Siirt-colored mohair goat (Independent Samples t test)

	Gender	N	Mean	Std. Deviation	P
SL	Male	10	65.22	1.80	0.009*
	Female	10	61.64	0.85	
EL	Male	10	15.84	1.07	0.002*
	Female	10	13.48	0.45	
CL	Male	10	15.76	0.67	0.473
	Female	10	13.42	0.56	
BL	Male	10	9.88	0.44	0.605
	Female	10	8.52	0.40	
TL	Male	10	20.47	0.63	0.126
	Female	10	18.14	0.37	

* : $P<0.01$

Table 2. Statistical analysis of Romanov sheep hyoid bone (Independent Samples t test)

	Gender	N	Mean	Std. Deviation	P
SL	Male	10	63.22	1.99	0.022*
	Female	10	59.63	0.74	
EL	Male	10	13.84	1.07	0.163
	Female	10	12.77	3.45	
CL	Male	10	13.74	0.68	0.229
	Female	10	12.02	1.14	
BL	Male	10	7.62	1.60	0.183
	Female	10	6.52	0.40	
TL	Male	10	18.47	0.63	0.368
	Female	10	16.06	0.46	

* : $P<0.05$

Table 3. Correlation analysis of hyoid bone of Siirt-colored mohair goat and Romanov sheep (n:40)

	SL	EL	CL	BL	TL
SL	1				
EL	0.296	1			
CL	0.861(**)	0.403	1		
BL	0.561	0.367	0.656(*)	1	
TL	0.895(**)	0.517	0.894(**)	0.730(*)	1

DISCUSSION AND CONCLUSION

Due to its high fertility, the Romanov sheep breed is a widely bred breed in the world. Due to the disadvantages of 2D examinations in the anatomical definition of a structure, 3D modeling has gained importance (15,16). Our study is the first to include 3D modeling of the hyoid bone in sheep and goats.

Morphometric studies on hyoid bone in sheep and goat breeds are quite limited in the literature (13). In a study (17), on fetal development of sheep the morphometry of the hyoid bone was measured between the 12th and 20th weeks. In the study, the SL parameters were determined to be 12 ± 0.408 mm and 26.375 ± 0.239 mm at the 12th and 20th weeks, respectively. In a study conducted in humans (18), the average left hyoid length in males and females was found to be 39.54 ± 5.13 mm and right hyoid length was 39.25 ± 5.02 mm. Right and left SL lengths were measured as 25.61 ± 4.53 mm and 25.44 ± 4.50 mm, respectively, in males. The same parameter was reported in females as 24.79 ± 4.11 mm and 24.79 ± 4.11 mm on the right and left sides. In our study, the SL parameter was determined as 65.22 ± 1.80 mm in male goats and 61.64 ± 0.85 mm in female goats. A statistically significant difference was found between male and female goats in terms of SL value ($P<0.01$). Likewise, in the Romanov sheep breed, the same parameter showed a statistically significant difference between genders ($P<0.05$).

Rasouli and Yousefi (19) determined the radiological features of the skull in the Indian gray mongoose and aimed to define it macroscopically by making morphometric measurements of the hyoid bone. As a result of the study, CL and EL parameters were reported to be approximately 4-6 mm. In the 20 week old sheep fetus, CL and EL parameters were reported as 7 ± 0.0 mm and 4.875 ± 0.125 mm, respectively. Significant differences have been detected in the total lengths of the bones forming the hyoid apparatus between the 12th and 20th weeks of fetal development ($P<0.05$). The length of the stylohyoid bone has been found to be significantly different from all other hyoid bones ($P<0.05$). Additionally, the lingual process has shown a significant difference in length compared to the other bones ($P<0.05$). A statistically significant difference has also been observed between the lengths of the thyrohyoid and keratohyoid bones ($P<0.05$) (17). In our study, no difference was found between genders in terms of these two parameters in Romanov breed sheep. However, in Siirt-colored Mohair goats, while the CL parameter did not differ between genders, a statistical difference was detected in terms of the EL parameter. The EL parameter had a higher value in male goats than in female goats.

TL and basihyal length (BL) measurement data in the Indian gray mongoose have been reported as 7-8 mm (19). In a study (20) examined the osseous development of the hyoid bone of the New Zealand white rabbit and performed morphometric measurements at this stage. In a 1-day-old rabbit, the TL length was measured as 1.9 mm, and on the 7th day, it was 2.8 mm. In the last period of the study,

It was determined to be 4.2 mm. In Period 2, the length and width of the Basihyoid bone were reported as 2.2 mm and 2.5 mm, respectively. In our study, it was determined that TL and BL parameters did not show a statistical difference in male and female animals. However, the TL parameter had a positive correlation with SL and CL. Additionally, as

a result of the correlation analysis performed in the study, a positive correlation was determined between CL and SL measurement values. Statistically significant differences have been found in the ossification processes among all age groups ($P<0.05$).

In conclusion, the determined parameters were measured by making 3D modeling of the hyoid bone from the images obtained by computer tomography in Siirt colored mohair goat and Romanov sheep breeds. In addition to sex differences within the same species, two different species were also compared. It is thought that this study will contribute to relevant studies in the fields of veterinary medicine, anatomy, pathology, zoo-archaeology, and surgery.

FINANCIAL SUPPORT

No support was received from any organization in the conduct of this research.

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest to be declared by the authors.

CONTRIBUTIONS

The concept of the study was determined by MZA, Fİ, and BCG. The design of the study was created by BCG and Fİ. The study was supervised by MZA and Fİ. The resources were provided by MZA and BCG. The materials for the study were supplied by BCG, MZA, and Fİ. Data collection and/or processing were performed by MZA and Fİ. The analysis and/or interpretation of the study was carried out by BCG and Fİ. The literature review was conducted by MZA. The manuscript was written by MZA and Fİ. The critical review was performed by Fİ and MZA.

ETHICAL STATEMENT

With the ethics committee report numbered 2023/01/05 and 2023/01/03, the Siirt University Experimental Animals Application and Research Center approved the procedures used in our investigation.

REFERENCES

- Şen M, Uğurlu M (2021). Romanov koyun ırkında dölverimi özellikleri, yaşama gücü, büyüme performansı ve bazı vücut ölçüleri. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg.*, 16(2):155-163.
- Akcapınar, H (2000). Koyun Yetiştiriciliği, II. baskı, İsmat Matbaacılık, Ankara.
- Korkmaz MK, Emsen E (2018). Growth and reproductive traits of purebred and crossbred Romanov lambs in Eastern Anatolia. *Anim Reprod.*, 13(1):3-6.
- Yertürk M, Odabasıoğlu F (2007). Investigation on the yield characters of the colored mohair goats being bred in the eastern and southeastern parts of Anatolia. *Van Vet J.*, 18(2):45-50.
- König HE, Liebich HG (Ed), Türkmenoğlu İ (Çeviri Editörü) (2020). Veteriner Anatomi (Evcil Memeli Hayvanlar). 7. Baskı, Medipres, Malatya, Türkiye.
- Bolatlı G (2013). Multidedektör bilgisayarlı tomografi görüntülerinde os hyoideum morfolojisinin yaşa ve cinsiyete göre incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Jena AK, Duggal R (2011). Hyoid bone position in subjects with different vertical jaw dysplasias. *Angle Orthod.*, 81(1):81-85.
- Galvao C (2013). Hyoid bone's cephalometric positional study in normal occlusion and in malocclusion patients. *Rev Odontol UNESP.*, 12(1/2):143-152.
- Shimizu Y, Kanetaka H, Kim YH et al. (2005). Age-related morphological changes in the human hyoid bone. *Cells Tissues Organs*, 180(3):185-192.
- Bakıcı C, Akgün RO, Oto Ç (2019). The applicability and efficiency of 3 dimensional printing models of hyoid bone in comparative veterinary anatomy education. *Vet Hekim Der Derg.*, 90(2):71-75.
- McMenamin PG, Quayle MR, McHenry CR, Adams JW (2014). The production of anatomical teaching resources using three-dimensional (3D) printing technology. *Anat Sci Educ.*, 7(6):479-486.
- Baygeldi SB, Güzel BC, Kanmaz YA, Yılmaz S (2022). Evaluation of skull and mandible morphometric measurements and three-dimensional modelling of computed tomographic images of porcupine (*Hystrix cristata*). *Anat Histol Embryol.*, 51(4):549-556.
- Dayan MO, Demircioğlu İ, Koçyiğit A, Güzel BC, Karaavcı FA (2023). Morphometric analysis of the skull of Hamdani sheep via three-dimensional modelling. *Anat Histol Embryol.*, 52(2):215-222.
- İşbilir F, Güzel BC (2023). Morphometric analysis of the mandible of ram and ewe romanov sheep (*Ovis aries*) with 3D modelling: A CT study. *Anat Histol Embryol.*, 52(5):742-751.
- Vernon T, Peckham D (2002). The benefits of 3D modelling and animation in medical teaching. *J Audiov Media Med.*, 25(4):142-148.
- Rubio RR, Di Bonaventura R, Kournoutas I et al. (2020). Stereoscropy in surgical neuroanatomy: Past, present, and future. *Oper Neurosurg.*, 18(2):105-117.
- Ahmed NS, Mahmood SK (2013). Bone development in hyoid apparatus of indigenous sheep. *Aust. J Basic Appl Sci.*, 7(10):547-552.
- Kopuz C, Ortug G (2016). Variable morphology of the hyoid bone in anatolian population: clinical implications-a cadaveric study. *Int J Morphol.*, 34(4):1396-1403.
- Rasouli B, Yousefi MH (2023). Skull, mandible and hyoid apparatus in the Indian grey mongoose (*Herpestes edwardsii*): A comprehensive anatomical study. *Anat Histol Embryol.*, 52(3):373-380.
- Atalgın H, Kürtül I, Bozkurt EU (2007). Postnatal osteological development of the hyoid bone in the new zealand white rabbit. *Vet Res Commun.*, 31:653-660.

Immunohistochemical Expression of Beclin1 and Lc3 in the Ovary and Oviduct during Early Pregnancy in Rats

Sema USLU^{1,a,✉}, Füsün ERHAN BAYÇUMENDUR^{1,b}, Elif Nur TAŞ KEPENEK^{1,c}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0002-2239-7841, ^b0000-0001-9860-3771, ^c0009-0007-4349-8987

✉ Corresponding Author

Sema USLU

Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, TÜRKİYE

semauslu@cumhuriyet.edu.tr

Received

13.02.2025

Accepted

11.04.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1639180

How to cite: Uslu S, Erhan Bayçumendur F, Taş Kepenek EN (2025).

Immunohistochemical expression of beclin1 and lc3 in the ovary and oviduct during early pregnancy in rats. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):23-27.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

Proteins associated with autophagy are called (Autophagy related proteins) Atg proteins. Atg6 (Beclin 1) complex regulates autophagy at the molecular level and lyses cytosolic proteins, organelles and cytoplasmic components in the autophagosome during autophagy. LC3 is an autophagosomal marker. Monitoring autophagy-related processes is very important in understanding pregnancy metabolism. In this study, Beclin 1 and LC3 were immunohistochemically demonstrated in the ovary and oviduct on day 5 in the first pregnancy period. Accordingly, on the 5th day of pregnancy, it was determined that autophagy continued to increase in pregnancy with the immunohistochemical (+) of Beclin 1, LC3 in interstitial cells, germinative epithelium, follicle granulosa cells and theca interna/externa in the ovary and epithelial cells in the oviduct.

Key Words: Autophagy, beclin 1, lc3, pregnancy, wistar albino rat

Ratlarda Gebeliğin Erken Döneminde Ovaryum ve Oviduktta Beclin1 ile LC3'ün İmmunohistokimyasal İfadesi

Öz

Otofaji ile bağlantılı proteinler (Autophagy Related Proteins), Atg proteinleri olarak isimlendirilir. Otofajinin moleküler düzeyde düzenlenmesinde Atg6 (Beclin 1) kompleksi ve otofaji sırasında otofagozomda sitozolik proteinleri, organelleri, sitoplazmik bileşenleri lize eden LC3 ise otofagozomal işaretleyicilerdendir. Otofaji ile ilgili süreçlerin izlenmesi gebelik metabolizmasının anlaşılmasında oldukça önemlidir. Yapılan çalışmada gebeliğin birinci periyodu içinde 5. günde ovaryum ve oviduktta Beclin 1, LC3 immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Buna göre gebeliğin 5. gününde ovaryumda intertisyel hücreler, germinatif epitelde, folikül granüloza hücrelerinde ve teka interna/eksternada, oviduktta ise epitel hücrelerinde, Beclin 1, LC3'ün immunohistokimyasal olarak (+) liği ile otofajinin gebelikte artarak devam ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beclin 1, gebelik, lc3, otofaji, wistar albino rat

INTRODUCTION

The process by which lysosomes catalyze the breakdown of damaged components, leftover molecules, and metabolic cellular contents is known as autophagy (1). It contributes to the maintenance of homeostasis (2). For cell physiology to continue, basal autophagy and cytoplasmic contents must remain constant throughout growth and development (3,4). Autophagy, together with the ubiquitin-proteasome system, eliminates spermatozoon mitochondria after fertilization and thus contributes to heteroplasmy. It is an essential biological function that acts as an auxiliary pathway to the degradation of the ubiquitin-proteasome system (5). After the late two-cell stage, autophagy shows high activity, targeting maternal mRNAs and proteins that may be required in the zygotic process (6). Autophagy is also vital for pre-implantation embryo development, cell differentiation and organogenesis (7).

Autophagy is realized by 3 different mechanisms. The first is macroautophagy, the second is microautophagy and the third is chaperone-mediated autophagy. Over thirty autophagy-related proteins (Atg proteins) are known to exist (8). Autophagosomes arise in structures called anterior autophagosomal structures (PAS). It has been reported that autophagy is shaped by four steps at the molecular level. In the first step, the mTor complex: Atg1-Atg13-Atg17 kinase complex, and the PIP3 complex in the second step: Atg6 (Beclin 1) complex that regulates the activity of Vps34, the emergence of the Ubiquitin-like system in the third step, and Atg9 and the loop system in the fourth step. After these processes, autophagy progresses in the cell as nucleation, membrane elongation, interaction with lysosome and destruction (9).

Beclin 1 initiates the formation of Vps34 autophagosomes in mammalian cells. Among the most basic processes for autophagic activity is the separation of Beclin 1 and Beclin 2. The microtubule-associated protein light chain 3 (LC3A/B-LC3I/II) protein complexes and the Atg12/Atg5/Atg16 complex regulate the elongation of autophagosomes (10). Cellular mTor mechanism control involves Beclin 1, Beclin 2, LKB1-AMPK-mTor, P53, and PI3K-Akt-mTor pathways (11). The endoplasmic reticulum, mitochondria, and perinuclear space are the locations of Beclin 1, which is expressed in human tissues. Beclin 1 is also involved in the formation of the double-membrane autophagosome, which is required for autophagy. Loss of Beclin 1 in humans leads to prostate, ovarian and breast cancers (12). The effect of Beclin 1 on luteinization and steroidogenesis in pregnancy has been investigated and it was found to be effective in progesterone synthesis. Beclin 1 is effective in the production of lipid droplets in steroidogenesis (13).

LC3 is a 1A/1B lightchain protein associated with microtubule formation. It is soluble in mammalian tissues and cultured cells with a molecular mass of approximately 17kDa. It lyses cytosolic proteins, organelles and cytoplasmic components in the autophagosome during autophagy. A cytosolic form of LC3 (LC3-I) is conjugated to phosphatidylethanolamine to form the LC3- phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II), which is taken up into autophagosomal membranes. Autophagosomes fuse with lysosomes to form autolysosomes and intra-autophagosome components are degraded

by lysosomal hydrolases, degrading LC3-II. LC3-II is an autophagosomal marker. An effective technique for tracking autophagy-related activities, such as autophagy and autophagic cell death, is the detection of LC3 by immunoblotting or immunofluorescence (10).

This study aimed to investigate the intensity of autophagy in the ovary and oviduct in the first period of pregnancy in rats and to reveal the distribution of Beclin 1 and LC3, which are responsible for different steps of autophagy, immunohistochemically.

MATERIAL AND METHODS

Establishment of Experimental Protocols and Groups

Twelve 60-day-old female Wistar Albino rats obtained from Sivas Cumhuriyet University Experimental Animals Center were used. The rats were split into two groups, one for pregnancy induction and one for control, each with six animals. The animals in each cage were kept in an environment with a temperature of 22±2, 12 hours of light/12 hours of darkness, ad libitum water and food.

One male animal per female was housed in a separate cage for one night in the pregnancy group. The vaginal cytology procedure was then used to evaluate the swabs obtained from the female animals. This approach involved transferring the swab samples on a slide and fixing them in methyl alcohol for three minutes. After ten minutes of toluidine blue staining on the air-dried slides, the preparations were closed and assessed.

The animals considered to be on Day 0 of pregnancy were those in which spermatozoa were seen in the preparations under examination. The ovaries and the middle part of oviduct of the animals in the control group and those on the 5th day of pregnancy were removed.

Immunohistochemistry

Following a 24-hour fixation in 10% neutral buffered formaldehyde, the ovaries and oviducts were embedded in paraffin blocks after undergoing routine tissue processing steps. Serial slices 50µ apart and 5µ thick were obtained from the prepared paraffin blocks using a microtome (Leica RM 2125). The slices were put on adhesive slides and the streptavidin-biotin complex (sABC) staining technique was employed to assess the distribution and density of LC3 and Beclin-1. The antigen retrieval procedure was initiated following the sections' de-paraffinization in xylenes and dehydration in alcohol series. Slides dipped in a 10-fold diluted citrate buffer solution were cooked for 20 minutes at 600 watts in a microwave oven to retrieve antigen. Following a 20-30 minute cooling period, the sections were rinsed for 15 minutes in PBS solution and then incubated for 20 minutes in the dark in a 3% hydrogen peroxide-methyl alcohol solution to inhibit endogenous peroxidase activity. After incubation, the sections were washed again with PBS solution for 15 minutes. After this stage, Ultra V Block solution was dropped on the tissues to prevent nonspecific antibody binding, waited for 10 minutes, and then incubated with diluted primary antibody at +4°C overnight without washing. As primary antibodies, Beclin-1 (Afbitech-AF5128) and LC3 (Proteintech-14600-1-AP) were adminis-

tered at 1/100 dilution. Following primary antibody incubation, slices were submitted to standard immunohistochemistry techniques, followed by a 15 minute PBS wash, and the response was shown using AEC chromogen. In the negative control, PBS was used in place of the primary antibody following protein blocking, and the tissues were incubated with this solution for an entire night. Sections counterstained with Gill's hematoxylin were covered with a water-based covering medium and viewed under a microscope. For this, staining intensity was scored between 0-3 (0; no staining, 1; slight staining, 2; moderate staining, 3; strong staining) The immunohistochemical staining results were assessed semiquantitatively and displayed in a table 1.

Table 1. Semiquantitative representation of the density and distribution in Beclin 1, LC3 immunohistochemical staining in the ovary and oviduct in the control group and in the first period of pregnancy.

		Control	Day 5
OVARY	Germinal Epithelium	Beclin 1	+
		LC3	++
	Interstitial Cell	Beclin 1	+
		LC3	+
	Granulosa Cell	Beclin 1	+
		LC3	+
	Corpus Luteum	Beclin 1	++
		LC3	++
OVIDUCT	Oviduct Epithelium	Beclin 1	+
		LC3	+
	Lamina Propria	Beclin 1	--
		LC3	--

RESULTS

On the fifth day of pregnancy and in the control group, the ovary and oviduct were assessed. The staining intensity and staining distribution of LC3 and Beclin-1 staining were assessed. The germinative epithelial cortex [wall of follicles (primary, secondary), interstitial cells, luteal cells in corpus luteum] and medulla were evaluated in the ovary. Epithelium in the mucosa and muscular and serosal layers in the oviduct were examined and evaluated, semiquantitatively shown in the Table 1. Since no positive reaction could be detected in the muscularis and serosa layers of the oviduct, it was not added to the table (Table 1).

It was observed that Beclin 1 and LC3 immune reactions increased in the germinative epithelium of the ovary. It was determined that the reaction intensity was similar in the interstitial cells, corpus luteum and luteal cells on the 5th day of pregnancy (Figure 1A, B, C, D) (Figure 2A, B, C).

In the oviduct, on the 5th day of pregnancy and in the control group, Beclin 1 and LC3 (+) reactions were observed to be of similar location and intensity in the epithelium, and +/- in places in the propria, muscles and serosa (Figure 3A, B, C, D).

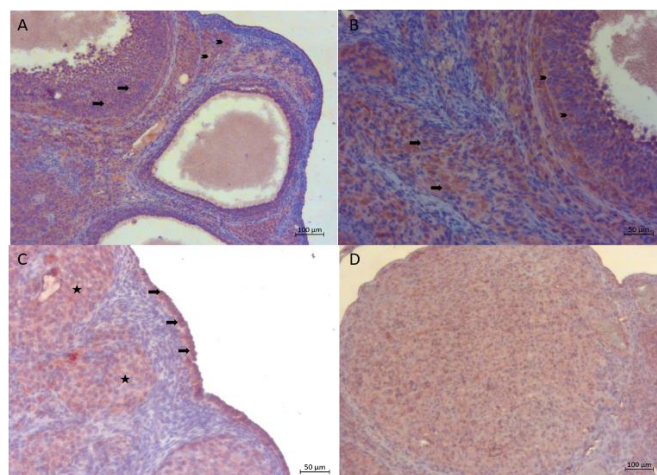


Figure 1. A. Ovary (Control) - Beclin 1. Immunopositive interstitial cells (arrows) and granulosa cells (arrowheads). (Scale bar: 100 µm). B. Ovary (Pregnancy, Day 5) - Beclin 1. Immunopositive interstitial cells (arrows) and granulosa cells (arrowheads). (Scale bar: 50 µm). C. Ovary (Control) - Beclin 1. Immunopositive interstitial cells (stars) and germinative epithelium (arrows). (Scale bar: 50 µm). D. Immunopositivity in the corpus luteum on Day 5 of pregnancy - Beclin 1. (Scale bar: 100 µm).

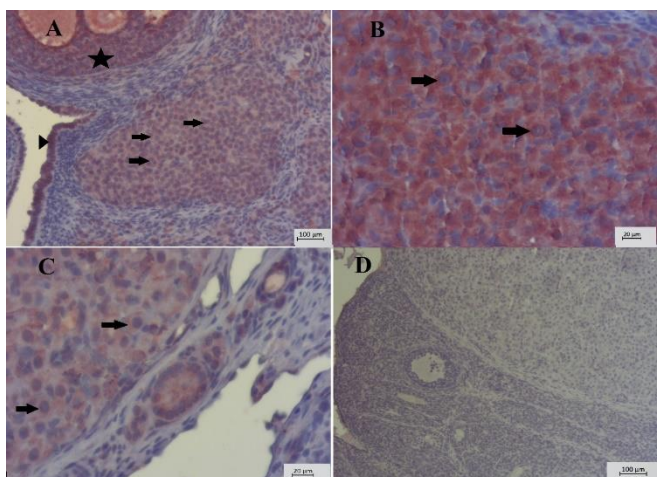


Figure 2. A. Ovary (Control) - LC3. Immunopositive interstitial cells (arrows), germinative epithelium (arrowhead) and granulosa cells (star). (Scale bar: 100 µm). B. Corpus luteum (Pregnancy, Day 5) - LC3. Immunopositive corpus luteum cells (arrows). (Scale bar: 20 µm). C. Ovary (Pregnancy, Day 5) - LC3. Immunopositive interstitial cells (arrows). (Scale bar: 20 µm). D. Ovary negative control (Scale bar: 100 µm).

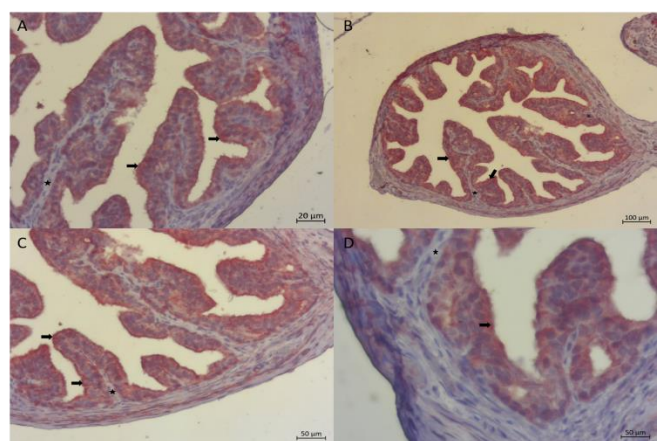


Figure 3. A. Oviduct (Control) - LC3. Immunopositive oviduct epithelium (arrows) and immunonegative lamina propria (star). (Scale bar: 20 µm). B. Oviduct (Pregnancy, Day 5) - Beclin 1. Immunopositive oviduct epithelium (arrows) and immunonegative lamina propria (star). (Scale bar: 100 µm). C. Oviduct (Control) - Beclin 1. Immunopositive oviduct epithelium (arrows) and immunonegative lamina propria (star). (Scale bar: 50 µm). D. Oviduct (Pregnancy, Day 5) - LC3. Immunopositive oviduct epithelium (arrow) and immunonegative lamina propria (star). (Scale bar: 50 µm).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Autophagy demonstrates that damaged cell organelles are re-applied to provide new structural remnants to maintain homeostasis (15). Autophagy is essential for follicular growth and differentiation in the ovary, oocyte development, follicular atresia and follicular maintenance of reproduction (16,17). Proper functional autophagy is important in the process from oogonia to follicle development and degeneration (18). has confirmed the effect of autophagy on female reproductive functions starting from oocyte development to postnatal remodelling, including implantation, pregnancy maintenance, and preservation of placental physiology (19). It has been reported that the possibility of oocyte maturation defect and germ cell deformity is associated with the deficiency of basic autophagic molecules. Therefore, the role of autophagy in the female reproductive system needs to be clearly understood (20).

Beclin 1, an important protein related to autophagy, also plays a role in cell differentiation, anti-apoptosis and cancer suppression (21). Another protein widely used as a monitoring tool for autophagic activation is LC3 (22). In the research by Zhao et al. (21), the immunohistochemistry expression of Beclin 1 was statistically found to be 16.7% in the control group. It has been stated that Beclin 1 is localized in the cell cytoplasm in the ovary, but no detailed information is given about the positive regions. In this study conducted in the ovary, it was observed that the distribution and localization sites of Beclin 1 and LC3 in pregnant and non-pregnant animals were similar and that the (+) level was in the cytoplasm and the nuclear (+) level was not, as in the study conducted by Zhao et al. in 2014 (21).

In mammals, the corpus luteum (CL) is a unique and transient endocrine gland that develops from follicle remnants following ovulation, which is essential for hormone homeostasis and pregnancy (23-25). When the CL ceases to function in the absence of pregnancy or at the end of pregnancy, it ceases to produce progesterone and then undergoes a period of regression. Therefore, the luteolysis process is considered as an important step for the maintenance of ovarian homeostasis and the resumption of the next estrous cycle (24, 25). Previous investigations have indicated that apoptosis is the key process leading to the death of luteal cells and the regression of CL (24, 25), but the function of autophagy in pregnancy luteolysis remains unclear (26). Few studies have investigated the mechanism of autophagy in the initial stage of pregnancy luteolysis (26).

The LC3 protein levels in the corpus luteum of the control group grew considerably throughout the first trimester of pregnancy, according to the Western-Blot analysis of LC3 protein levels in the research by Tang et al. (26) with pregnant rats. Therefore, they stated that autophagy may play a role in the luteolysis of pregnant rats in the initial period of pregnancy. However, immunohistochemical staining was not performed for LC3 in the study. The immunohistochemistry distribution of LC3 and Beclin 1 was found to be comparable in this investigation; however, staining density and intensity differed from location to location. It was thought that this variability could be due to the reasons reached in the study results of Tang et al. (26). It was concluded that the ovarian tissue should be examined again in the later stages of pregnancy and the evaluation should be made.

While our investigation found Beclin and LC3 positivity in certain parts of the ovary and oviduct autophagy also plays a significant role in the regression of the corpus luteum during false pregnancy, and its significance in pregnancy luteolysis is yet unknown (26). As a result, the purpose of this study was to look at autophagy in rats' luteal processes during early pregnancy. The findings of autophagy-related protein LC-3 and Beclin-1 suggest that autophagy is relatively high during the first trimester of pregnancy. Growth retardation during pregnancy has been linked to autophagosome production and LC3 and Beclin 1 expression, and aberrant placentation has been linked to an imbalance in cell homeostasis (27-29). Autophagy has been reported to be elevated higher in placentas with fetal growth retardation than in normal placentas due to the expression of LC3, Beclin 1, and the Atg family (30). The function of autophagy in the ovaries and oviduct during pregnancy has not been completely clarified, even though the processes underlying autophagy during cellular proliferation and development are well understood. The fact that the distribution and density of autophagy in the ovary and oviduct are different during pregnancy has shown that autophagy is effective not only fatally but also maternally.

Gawriluk et al. (13) demonstrated that Beclin1 is required for female reproduction for the corpus luteum to function properly during pregnancy, and they stated that the success of mammalian reproduction is dependent on the production of hormones that not only promote germ cell development in the female but also ensure the establishment and maintenance of pregnancy. They found that a lack of the important autophagy gene Beclin1 in progesterone-producing cells in the ovary reduces circulating progesterone in pregnant mice and that exogenous progesterone administration causes a preterm labour phenotype, indicating that progesterone is an essential hormone in mammalian pregnancy. They added that these findings show that autophagy may have a role in steroidogenesis, and hence in successful reproduction, and that future research should focus on the autophagy-dependent and autophagy-independent activities of Beclin1 in the ovarian process. The findings of this study support the link between hormonal changes and autophagy.

Choi et al. (31) showed very weak LC3 immunoreactivity in the corpus luteum on day 2 of pseudopregnancy in pseudopregnancy rats. After day 7, immunoreactivity for LC3 increased, and very intense immunoreactivity for LC3 was seen in luteal cells on days 14 and 20. In addition, it was stated that intermediate fibroblasts and stromal cells in the corpus luteum showed very weak LC3 immunoreactivity throughout their study.

In their studies conducted on the ovary in the prepubertal period in rats (17), they reported that LC3 immunolocalization was very intensely positive in primordial follicles, primary and preantral follicles granulosa cells while in late antral follicles, the positivity was high in granulosa cells and weak in theca follicles. The same study also found that LC3 could not be detected in the cytoplasm of oocytes at any developmental stage. In the study, the (+) status was found to be similar in granulosa cells (17) while the (+) status was occasionally encountered in oocytes.

In conclusion, the study determined that the immunohistochemistry distribution of Beclin 1 and LC3 in the ovary

and oviduct is connected to the pregnancy period and hormonal process and that it fluctuates. It is thought that this study will contribute to the literature on this subject by forming the basis for studies to be conducted on autophagic molecules in the later stages of pregnancy.

FINANCIAL SUPPORT

No support was received from any organization in the conduct of this research.

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest to be declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SU participated in the planning, design, and writing of the study. ENTK contributed to data collection, processing, and editing of the manuscript. The analysis and interpretation of the data were performed by SU and FEB. All authors contributed to the critical review of the study.

ETHICAL STATEMENT

Approval was acquired from the Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision dated 22.09.2023 and numbered 65202830-050.04.04-776 and the study was carried out in compliance with the ethics committee instruction.

REFERENCES

- Ozpolat B, Benbrook DM (2015). Targeting autophagy in cancer management—strategies and developments. *Cancer Manag Res.*, 291-299.
- Kadowaki M, Karim MR, Carpi A et al. (2006). Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Aspects Med.*, 27(5-6):426-443.
- Al Rawi S, Louvet-Vallee S, Djeddi A et al. (2011). Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334 (6059):1144-1147.
- Sato M, Sato K (2011). Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*, 334:1141-1144.
- Song WH, Yi YJ, Sutovsky M et al. (2016). Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci.*, 113(36):e526-570.
- Stitzel ML, Seydoux G (2007). Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science*, 316(5823):407-408.
- Di Bartolomeo S, Nazio F, Cecconi F (2010). The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic*, 11(10):1280-1289.
- Xie Z, Klionsky DJ (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.*, 9(10):1102.
- Arsalan DÖ, Korkmaz G, Gözüağık D (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *AÜHSJ.*, 4:184-194.
- Mooren FC, Krüger K (2015). Exercise, autophagy, and apoptosis. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 135:407-422.
- Chen S, Rehman SK, Zhang W et al. (2010). Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta (BBA) Bioenerg.*, 1806:220-229.
- Aita VM, Liang XH, Murty VV et al. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1):59-65.
- Gawriluk TR, Rucker EB (2015). BECN1, corpus luteum function, and preterm labor. *Autophagy*, 11(1):183-184.
- Uslu D, Uslu S (2024). Immunohistochemical investigation of autophagy in the uterus during the first trimester of pregnancy in rats. *Van Vet J.*, 35(1):59-63.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 27:107-132.
- Zhou JZ, Way SS, Chen K (2018). Immunology of the uterine and vaginal mucosae. *Trends Immunol.*, 39(4):302-314.
- Choi JY, Jo MW, Lee EY et al. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil Steril.*, 93:2532-2537.
- Zhang C, Hu J, Wang W et al. (2020). HMGB1-induced aberrant autophagy contributes to insulin resistance in granulosa cells in PCOS. *FASEB J.*, 34(7):9563-9574.
- Cao B, Camden AJ, Parnell LA et al. (2017). Autophagy regulation of physiological and pathological processes in the female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.*, 77(5):e12650.
- Kumariya S, Ubba V, Jha RK et al. (2021). Autophagy in ovary and polycystic ovary syndrome: role, dispute and future perspective. *Autophagy*, 17(10):2706-2733.
- Zhao F, Zhao W, Ren S et al. (2014). Roles of SIRT1 in granulosa cell apoptosis during the process of follicular atresia in porcine ovary. *Anim Reprod Sci.*, 151(1-2):34-41.
- Klionsky DJ (2012). The autophagy community. *Autophagy*, 8(7):1003-1003.
- Wu L, Zhang Z, Pan X et al. (2015). Expression and contribution of the HIF-1 α /VEGF signaling pathway to luteal development and function in pregnant rats. *Mol Med Rep.*, 12(5):7153-7159.
- Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP et al. (2002). Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology*, 143(4):1495-1501.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.*, 28(1):117-149.
- Tang X, Liu B, Wang X et al. (2018). Epidermal growth factor, through alleviating oxidative stress, protect IPEC-J2 cells from lipopolysaccharides-induced apoptosis. *Int J Mol Sci.*, 19(3):848.
- Hung TH, Chen SF, Lo LM et al. (2012). Increased autophagy in placentas of intrauterine growth-restricted pregnancies. *PLoS One.*, 7(7):e40957.
- Gong JS, Kim GJ (2014). The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *CERM.*, 41(3):97.
- Bildirici I, Longtine MS, Chen B et al. (2012). Survival by self-destruction: a role for autophagy in the placenta?. *Placenta*, 33(8):591-598.
- Chifenti B, Locci MT, Lazzeri G et al. (2013). Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy. *CERM.*, 40(1):33.
- Choi J, Jo M, Lee E et al. (2011). The role of autophagy in corpus luteum regression in the rat. *Biol Reprod.*, 85(3):465-472.

Echinococcus granulosus sensu stricto'nun G1 ve G3 Genotiplerinin Ayırımında PZR-RFLP ve SSCP Metotlarının Eş Zamanlı Kullanımı

Figen ÇELİK^{1,a,✉}, Muhammed Ahmed SELÇUK^{1,2,b}, Muhammet USLUĞ^{1,c}, Afra Sena TEKİN^{1,3,d}, Sami ŞİMŞEK^{1,e,c}

¹Firat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE

²Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Siirt, TÜRKİYE

³Çukurova Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0002-2188-0196^a, 0000-0003-1769-4558^b, 0009-0003-3402-3606^c, 0009-0009-5637-5075^d, 0000-0002-3567-326X^e

✉ Corresponding Author

Figen ÇELİK

Firat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ,
TÜRKİYE

f.celik@firat.edu.tr

Received

12.02.2025

Accepted

14.05.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1638862

How to cite: Çelik F, Selçuk MA, Usluğ M, Tekin AS, Şimşek S (2025). *Echinococcus granulosus sensu stricto'nun G1 ve G3 Genotiplerinin Ayırımında PZR-RFLP ve SSCP Metotlarının Eş Zamanlı Kullanımı*. Dicle Univ Vet Fak Derg., 18(1):28-32.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).



Öz

Kistik ekinokokkozis (KE), dünya çapında insan ve hayvanlarda yaygın olarak rastlanan ihmal edilmiş bir halk sağlığı ve ekonomik sorundur. Bu çalışmanın amacı, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) izolatları içerisinde G1 ve G3 genotiplerinin PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PZR-RFLP) ve takiben Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) teknikleriyle ayırımının yapılmasıdır. Çalışmada kullanılan insan, sığır ve koyun hidatik kist izolatlarına ait genomik DNA (gDNA)'lar *E. granulosus* s.s. (G1/G3) olduğu DNA dizi analizi ile teyit edilen örnekler arasından seçilmiştir. Genomik DNA'lar, *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerini ayırt eden mt-nad5 bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bu PZR ürünleri *MbolI*, *HindIII* ve *HphI* restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesildi. Daha sonra hazırlanan SSCP jeline bu kesim ürünleri yüklendi ve elektroforeze tabi tutulup jel gümüş nitrat ile boyanarak bantlar görünür hale getirildi. Bu çalışmada hepsi Elazığ ilinden elde edilen ikisi insan, altısı sığır ve 13'ü koyun olmak üzere toplam 21 izolat analiz edildi. Bütün örneklerde *E. granulosus* s.s.'un 759 bp'lik mt-nad5 gen bölgesi PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltıldı. RFLP neticesinde *MbolI* enzimi G1 ve G3 genotiplerine ait PZR ürünlerini dört farklı pozisyonundan, *HindIII* iki farklı ve yine *HphI* de iki farklı pozisyonundan kesti. Takiben yapılan SSCP analizinde bütün örneklerin aynı bant profilini göstermesi nedeniyle *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin bu yöntemle ayırt edilemeyeceği anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, genotip, PZR, RFLP, SSCP

Simultaneous Use of PCR-RFLP and SSCP Methods for Differentiation of G1 and G3 Genotypes of *Echinococcus granulosus sensu stricto*

Abstract

Cystic echinococcosis (CE) is a neglected public health and economic problem affecting both humans and animals worldwide. The study aimed to differentiate G1 and G3 genotypes among *E. granulosus* s.s. (G1/G3) isolates using PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) followed by Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) techniques. The study selected genomic DNA (gDNA) from confirmed *E. granulosus* s.s. (G1/G3) human, cattle, and sheep hydatid cyst isolates. PCR was used to amplify the mt-nad5 region of *E. granulosus* s.s. with primers that distinguish G1 and G3 genotypes. The resulting PCR products were digested separately with *MbolI*, *HindIII*, and *HphI* restriction enzymes. The digestion products were then loaded onto the prepared SSCP gel and subjected to electrophoresis. Finally, the gel was stained with silver nitrate to make the bands visible. The study analysed a total of 21 isolates, comprising two human, six cattle, and 13 sheep, all obtained from Elazığ province of Türkiye. The PCR successfully amplified the 759 bp mt-nad5 gene region of *E. granulosus* s.s. in all samples. As a result of RFLP, *MbolI* enzyme cut the PCR products of G1 and G3 genotypes at four different positions, *HindIII* at two different positions and *HphI* at two different positions. The subsequent SSCP analysis revealed that the G1 and G3 genotypes of *E. granulosus* s.s. could not be differentiated using this method, as all samples displayed an identical band profile.

Key Words: *Echinococcus granulosus*, genotype, PCR, RFLP, SSCP

GİRİŞ

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus* sensu lato'nun larvası olan hidatik kist tarafından oluşturulan, ihmal edilmiş bir zoonotik hastalıktır. Parazitin erişkin formu köpek, kurt, çakal ve diğer bazı etçillerin ince bağırsaklarında yaşarken, larvası olan hidatik kist ise insanlar dahil koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memelide çoğunlukla karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda yerleşmektedir (1). Mitokondriyal ve nükleer DNA dizilemesine dayanarak, *E. granulosus* s.l. içerisinde beş türü tanımlanmıştır. Bu türler arasında *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1 ve G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis* (G6/7, G8 ve G10) ve *E. felidis* bulunmaktadır (2-4).

Başlangıçta *E. granulosus* s.s. G1, G2 ve G3 olmak üzere üç genotipten oluşmaktaydı. Ancak son yıllarda yapılan tam genom sekansları neticesinde G2'nin ayrı bir genotip olmadığı, G3'ün bir mikrovaryantı olduğu ortaya konmuştur (5). *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin ayrımı genellikle mitokondriyal sitokrom c oksidaz subunit 1 (mt-CO1) geninin sekans analizi ile yapılır (6). Bununla birlikte son çalışmalarda *E. granulosus* s.s. genotiplerinin ayırt edilmesi için daha uzun mt-CO1 gen bölgelerinin analiz edilmesi gerektiği gösterilmiştir (7, 8). Filogenetik analizlere göre, G1 ve G3 arasında 37 nükleotidlik bir fark vardır (5). Daha uzun mt-CO1 gen dizilerinin (1609 bp) yanı sıra kısmi mt-CO1 (366 bp) ve nad1 (471 bp) dizileri bile G1 ve G3 arasında doğru bir ayırım yapamamaktadır (5). Nitekim son çalışmalar, mt-nad5 geninin kısa bir parçasında, G1 ve G3 genotiplerinin tamamen ayırt edilmesini sağlayan üç tek nükleotid polimorfizminin ve altı informatif pozisyonun varlığını ortaya koymuştur (5).

Türkiye'de *E. granulosus* s.l.'nin tür ve genotiplerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, hayvan ve insan konaklarından elde edilen izolatlarda *E. granulosus* s.s. (G1/G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) ve *E. canadensis* (G6/G7) tespit edilmiştir (2-4, 9, 10). Cengiz ve Gönenç (11), Türkiye'nin farklı illerinden 49 kist hidatik izolatını (10 sığır ve 39 koyun) mt-nad5 genini dizileyerek analiz etmiş ve G1 (n = 36) ve G3 (n = 13) genotiplerini ayırt etmişlerdir. Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, 12'si insan, 28'i sığır ve 31'i koyun hidatik kist izolatlarının 759 bp uzunluğundaki mt-nad5 gen fragmanı PZR ile çoğaltılarak sekanslatılmıştır. Sekans sonuçlarına göre 61 örneğin *E. granulosus* s.s. G1 genotipi, 10 örneğin ise G3 genotipi olduğu belirlenmiştir (12). Elazığ ve Erzurum illerinden toplanan 54 koyun ve sığır örneği ile yapılan başka bir çalışmada ise PZR-Single Stranded Conformation Polymorphism (PZR-SSCP) analizi denenmiştir. Analiz sonucunda G1 ve G3 arasındaki fark tanımlanamazken, G5 ve G7'nin diğer izolatlardan farkı ortaya konmuştur (13).

Bu çalışmanın amacı, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) izolatları içerisinde G1 ve G3 genotiplerinin PZR-Restriction fragment length polymorphism (PZR-RFLP) ve takiben SSCP teknikleriyle ayrımının yapılabilirliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada kullanılan insan, sığır ve koyun hidatik kist izolatlarına ait genomik DNA (gDNA)'lar *E. granulosus* s.s. (G1/G3) olduğu DNA dizi analizi ile teyit edilen örnekler ara-

sından seçilmiştir (12). Bu izolatların isimleri, GenBank erişim numaraları, konakları ve genotipleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *E. granulosus* s.s. izolatlarının Genbank erişim numaraları, ait olduğu konaklar ve genotipleri.

No	İzolat Adı	Genbank Erişim Numarası	Konak	Genotip
1	TRH04	OP889045	İnsan	G1
2	TRC02	OP889055	Sığır	G1
3	TRC03	OP889056	Sığır	G1
4	TRC11	OP889064	Sığır	G1
5	TRC13	OP889066	Sığır	G1
6	TRC28	OP889081	Sığır	G1
7	TRS02	OP889083	Koyun	G1
8	TRS05	OP889086	Koyun	G1
9	TRS06	OP889087	Koyun	G1
10	TRS08	OP889089	Koyun	G1
11	TRS09	OP889090	Koyun	G1
12	TRS10	OP889091	Koyun	G1
13	TRS12	OP889093	Koyun	G1
14	TRS14	OP889095	Koyun	G1
15	TRH10	OP889051	İnsan	G3
16	TRC04	OP889057	Sığır	G3
17	TRS21	OP889102	Koyun	G3
18	TRS23	OP889104	Koyun	G3
19	TRS25	OP889106	Koyun	G3
20	TRS28	OP889109	Koyun	G3
21	TRS29	OP889110	Koyun	G3

Mitokondrial NADH Dehydrogenase Subunit 5 (mt-nad5) Geninin PZR ile Çoğaltılması

Genomik DNA'lar, Kinkar ve ark. (5) tarafından dizayn edilen ve *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerini ayırt eden EGnd5F1 (5'-GTTGTTGAAGTTGATTGTTTGTG-3') ve EGnd5R1 (5'-GGAACACCGGACAAACCAAGAA-3') primerleri kullanılarak 759 bp'luk mt-nad5 gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu şu şekilde oluşturuldu: 5 µL 10X PZR tamponu, 5 µL MgCl₂ (25 mM), her dNTP'den 400 µM, her primerden 20 pmol, 0.2 µL Taq DNA Polimeraz (1.25 IU) ve 28.8 µL steril saf su ile toplam hacim 45 µL olarak hazırlanıp üzerine 5 µL kalıp DNA eklendi. Kinkar ve ark. (5) tarafından daha önce belirlenen bir touch-down PZR protokolü kullanıldı (5). Thermal cycler koşulları, 95 °C'de 1 dk ön denatürasyon, takiben 95 °C'de 20 sn, 55 °C'de 45 sn (tavla sıcaklığı her döngüde kademeli olarak 0,5 °C azaltıldı), 68 °C'de 1 dk olacak şekilde 10 siklus ve ardından 95 °C'de 20 sn, 50 °C'de 45 sn, 68 °C'de 1 dk olacak şekilde 25 siklus ve 68 °C'de 3 dk son uzama işlemine tabi tutuldu. PZR ürünleri daha sonrasında %1.4'lük agaroz jelde 100 volt akımda 40 dk elektroforeze tabi tutuldu ve sonrasında jel görüntüleme cihazında (Quantum, Vilber Lourmat, France) görüntülendi.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Çalışmada kullanılan *E. granulosus* s.s. izolatlarına ait mt-nad5 sekanslarını kesen restriksiyon enzimleri (RE)'nin belirlenmesi amacıyla bütün sekans verileri ayrı ayrı Restriction-Mapper (<https://www.restrictionmapper.org/>) veri tabanında kontrol edildi ve bu sekansları en az iki noktadan kesen üç enzimin kullanılmasına karar verildi. Bu enzimler, *MbolI* (5 U/µL, 300U Thermo Scientific), *HindII* (5 U/µL, 300U Thermo

Scientific) ve *HphI* (5 U/μL, 300U Thermo Scientific) idi. Enzim kesim reaksiyonu 10 μL PZR ürünü, 1 μL RE, 2 μL 10X Buffer B ve 18 μL steril saf su ile toplam hacim 31 μL olacak şekilde ayrı eppendorf tüplerde hazırlandı. Daha sonra üretici firmanın (Thermo Fisher, Bartlesville, USA) belirlediği koşullarda 37 °C'deki su banyosunda 8 saat enzim kesimi gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda ise 65 °C'de 20 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Sonrasında kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde 100 volt akımında 40 dk elektroforeze tabi tutuldu ve jel görüntüleme cihazında (Quantum, Vilber Lourmat, France) görüntülendi (4).

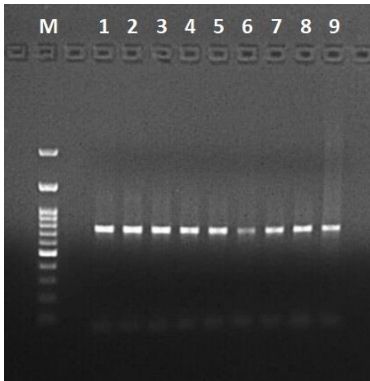
Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP)

Bu yöntem Simsek ve ark. (13) tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirildi. SSCP jeli, 2 ml %40 akrilamid-N,N' Metilenbisakrilamid (39:1), 825 μL 5X Tris Borik Asit-EDTA (TBE), 1 ml gliserol, 500 μL 1M üre, 150 μl %10 amonyum peroksit disülfat, 4575 μL saf su ve 4 μL Tetrametiletildiamin (TEMED) ile hazırlandı. PZR ürünlerinin tek iplik haline getirilmesi için 5 μL hem PZR hem de enzim kesimine uğramış PZR ürünlerinden ayrı tüplere alınarak 11 μL denatüre edici tampon (10 mM NaOH, %95 formamit, %0.05 bromfenol blue ve %0.05 ksilen siyanol) ile homojen bir şekilde karıştırıldı. Elde edilen karışım Thermal Cycler'da 95 °C'de 10 dk denatürasyona maruz bırakıldı. Ardından hemen buz blok üzerine alınarak (-20 °C) SSCP jelinin kuyucuklarına her örnekten 5 μL yüklendi ve 175 volt akımda 2 saat elektroforeze tabi tutuldu. Sürenin sonunda plakalardan çıkarılan jel, gümüş nitrat ile boyandı. Bu amaçla, poliakrilamid jel %10 etanol, %5

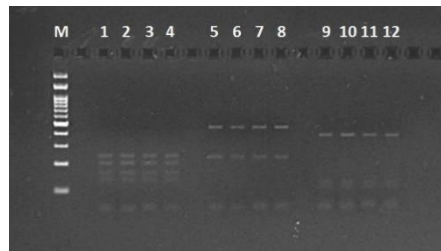
asetik asit ve % 85 distile su içerisine alınarak 6 dk boyunca çalkalanıp fikse edildi. Ardından jel %0.1 gümüş nitrat boyası içerisine alınarak 15 dk orta hızda çalkalanıp boyandı. Bantların görünür hale gelmesi için %1.5 Sodyum hidroksit (NaOH) ve %0.15 formaldehit içerisinden 30 dk çalkalandı. Jel, son olarak %0.75 sodyum karbonat (Na₂CO₃) içerisine alınarak 10 dk çalkalandı ve distile su küvetine alınarak 5 dk yıkama işlemi yapıldıktan sonra görüntülendi.

BULGULAR

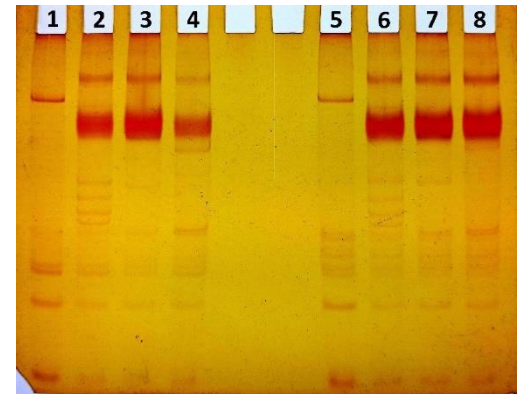
Bu çalışmada hepsi Elazığ ilinden elde edilen ikisi insan, altısı sığır ve 13'ü koyun olmak üzere toplam 21 izolat analiz edildi. Tüm örneklerde *E. granulosus* s.s.'nin 759 bp'lik mt-nad5 gen bölgesi PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltıldı (Şekil 1). Sonrasında bu örnekler SSCP analizine tabi tutuldu, ancak yeterli ayırım sağlanamadığı için öncelikle PZR-RFLP yapıp kesim ürünlerinin SSCP yapılmasına karar verildi. Böylelikle bütün izolatların mt-nad5 PZR ürünleri *MbolI*, *HindII* ve *HphI* enzimleri ile kesime tabi tutuldu. Enzim kesimi sonrası farklı DNA fragmentlerinin oluştuğu görüldü (Şekil 2). *E. granulosus* s.s.'nin her iki genotipi de *MbolI* ile kesildiğinde dört farklı, *HindII* ile iki farklı ve yine *HphI* ile iki farklı yerden kesimin olduğu görüldü. Takiben PZR-RFLP ürünleri SSCP jeline yüklenip gümüş nitrat ile boyandı, ancak elde edilen bantlar incelendiğinde hepsinin aynı bant profilini gösterdiği (Şekil 3) ve bu nedenle *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin bu yöntemle ayırt edilemeyeceği ortaya kondu.



Şekil 1. *E. granulosus* s.s. (G1/G3) mt-nad5 genine ait PZR sonuçlarının jel görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-9: Rastgele seçilen bazı örneklerin bant profilleri (759 bp)



Şekil 2. *E. granulosus* s.s. (G1/G3) mt-nad5 genine ait PZR-RFLP sonuçlarının jel görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-4: *MbolI*; 5-8: *HindII*; 9-12: *HphI*.



Şekil 3. *Echinococcus granulosus* s.s.'nin mt-nad5 PZR ürünlerinin SSCP analizi. 1: PZR ürünü (G1); 2: *MbolI* ile kesilmiş PZR ürünü (G1); 3: ile *HindII* kesilmiş PZR ürünü (G1); 4: *HphI* ile kesilmiş PZR ürünü (G1); 5: PZR ürünü (G3); 6: *MbolI* ile kesilmiş PZR ürünü (G3); 7: *HindII* ile kesilmiş PZR ürünü (G3); 8: *HphI* ile kesilmiş PZR ürünü (G3).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) neticesinde elde edilen ürünlerdeki mutasyonların tanımlanması için altın standart yöntem sekans analizidir. Ancak, özellikle popülasyon çalışmalarında çok sayıda örnek çalışmak gerektiğinde tüm PZR amplikonlarının dizilenmesi, masraflı ve zaman alıcıdır (14). Bu nedenle, PZR sonrası mutasyon tespitinde alternatif yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlardan biri pratik bir elektroforetik mutasyon tarama yaklaşımı olan SSCP'dir (15). Bu teknik, tek sarmallı bir DNA molekülünün denatüre olmayan bir

jel içindeki elektroforetik hareketliliğinin yapısına ve boyutuna büyük ölçüde bağlı olduğu ilkesine dayanır ve <500 bp'lik PZR ürünlerinde tek nokta mutasyonlarını tespit etme kapasitesi sunar. PZR-SSCP'nin yüksek mutasyon saptama kapasitesi ve nispeten basit bir teknik olması, onu türlerin veya genotiplerin tanımlanması, çok sayıda örnek içinde ve örnekler arasında genetik değişkenliğin taranması ve daha da önemlisi bilinmeyen mutasyonların belirlenmesi için güçlü bir araç haline getirmektedir (15). Böylelikle, bir popülasyondaki genetik varyasyonun kapsamını değerlendirmek için bir tarama aracı olarak kullanıldığında, örneklerin hedef-

lenen dizilemesinden önce PZR-SSCP analizi yapılması dizileme gerektiren örneklerin sayısında önemli bir azalmaya (genellikle %70-90) ve dolayısıyla analizlerle ilişkili maliyetlerin düşmesine imkân sağlamaktadır (15). PZR-SSCP'nin pratik, hassas, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır (16). Yöntemin standartlaştırılmış bir protokol izlemesi (böylece yüksek bir mutasyon tespit oranı elde edilmesi) ve sonuçların dikkatli bir şekilde yorumlanması koşuluyla, SSCP önemli bir tanısal kapasiteye sahip olup seçilen örneklerin dizilenmesi ve dizi verilerinin filogenetik analizleri ile birlikte örneklem prosedürlerine ve genetik belirteçlere dikkat edilirse, *E. granulosus*'un popülasyon genetiği ve epidemiyolojisinin araştırılması için uygundur (17,18). Ancak, PZR-SSCP 500 bp fragmanlara kadar polimorfizmi tespit edebilir. PZR-SSCP'den maksimum verimi almak için amplikonların optimum boyutu 330 ila 380 bp arasında olmalıdır (19). Bu handikapı gidermek için mevcut çalışmada öncelikle PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle küçük parçalara ayrılması (PZR-RFLP) ve daha sonra SSCP yapılmasının mutasyon tespit kapasitesini artırabileceği düşünülmüştür. PZR-RFLP tekniğinde, bir PZR ürünü çeşitli boyutlarda birkaç DNA parçası oluşturmak için tanıma bölgesi olarak bilinen bölgelerden DNA'yı kesen belirli restriksiyon enzimleriyle muamele edilir. Daha sonra, kesilmiş amplikonlar bir jele yüklenir ve elektroforeze tabi tutulur. Böylelikle, farklı boyutlardaki bantlar jel boyunca farklı büyüklüklerde bant oluşturacaktır (20). Simsek ve ark. (13), *E. granulosus* s.l.'nin 446 bp'lik mt-CO1 gen bölgesini PZR ile çoğalttıktan sonra yaptıkları PZR-SSCP analizi ile G5 ve G7 genotiplerini ayırt ederken, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) içerisindeki G1 ve G3 genotiplerini tanımlayamamışlardır. Benzer şekilde Zhang ve ark. (21) ve Oudni-M'rad ve ark. (22) da *E. granulosus* s.s. içerisindeki G1 ve G3 genotiplerinin PZR-SSCP yöntemiyle ayırt edememişlerdir. Bu çalışma ile *E. granulosus*'un 759 bp'lik mt-nad5 gen bölgesinin önce RFLP ile parçalara ayrılması ve takiben PZR-SSCP yapılmasına rağmen G1 ve G3 genotiplerinin ayırımında başarı sağlanamamıştır.

Sonuç olarak, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) içerisindeki genotip farklılıklarının tanımlanmasında PZR-SSCP'nin yetersiz kaldığı, bu nedenle özellikle mt-nad5 sekans analizinin gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

İnsan hidatik kist materyallerinin temini konusundaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ünal BAKAL'a teşekkür ederiz.

FİNANSAL BEYAN

Bu araştırmanın yürütülmesinde herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

YAZAR KATKILARI

Metodoloji, orijinal taslak yazma, inceleme ve düzenleme FC; Metodoloji, biçimsel analiz MAS, MU, AST; Danışmanlık, inceleme ve düzenleme SS. Tüm yazarlar makalenin yayım öncesi son halini okumuş ve kabul etmişlerdir.

ETİK BEYAN

Bu çalışma da kullanılan kist materyali mezbananede kesimi yapılan hayvanların takibi sonucu elde edildiği, canlı insan ve hayvan materyali kullanılmadığı için; etik kurul iznine ihtiyaç duyulmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Rickard MD, Lightowlers MW (1986). The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease (In): Immunodiagnosis of Hydatid Disease. Thompson RCA (Editors). George Allen and Unwin. London, England., 217-249.
2. Kesik HK, Simsek S, Kilinc SG, Koroglu E (2019). Identification of Antigen B (AgB) gene polymorphism in cattle and sheep isolates of Echinococcus granulosus and investigation of effects on serological diagnosis. *Acta Trop.*, 199:105099.
3. Simsek S, Balkaya I, Koroglu E (2010). Epidemiological survey and molecular characterization of Echinococcus granulosus in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Vet Parasitol.*, 172(3-4):347-349.
4. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP (2008). Molecular genetic characterization of different isolates of Echinococcus granulosus in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop.*, 107(2):192-194.
5. Kinkar L, Laurimae T, Acosta-Jamett G, et al. (2018). Distinguishing Echinococcus granulosus sensu stricto genotypes G1 and G3 with confidence: a practical guide. *Infect Genet Evol.*, 64:178-184.
6. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, et al. (2012). Genetic polymorphisms of Echinococcus granulosus sensu stricto in the Middle East. *Parasitol Int.*, 61(4):599-603.
7. Kinkar L, Laurimae T, Simsek S, et al. (2016). High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm Echinococcus granulosus sensu stricto genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. *Parasitol.*, 143(13):1790-1801.
8. Laurimae T, Kinkar L, Andresiuk V, et al. (2016). Genetic diversity and phylogeography of highly zoonotic Echinococcus granulosus genotype G1 in the Americas (Argentina, Brazil, Chile and Mexico) based on 8279 bp of mtDNA. *Infect Genet Evol.*, 45:290-296.
9. Simsek S, Roinioti E, Erosuz H (2015). First report of Echinococcus equinus in a donkey in Turkey. *Korean J Parasitol.*, 53(6): 731-735.
10. Avcioglu H, Guven E, Balkaya I, et al. (2021). The situation of echinococcosis in stray dogs in Turkey: the first finding of Echinococcus multilocularis and Echinococcus ortleppi. *Parasitol.*, 148(9):1092-1098.
11. Cengiz G, Gonenc B (2020). Comparison of molecular and morphological characterization and haplotype analysis of cattle and sheep isolates of cystic echinococcosis. *Vet Parasitol.*, 282: 109132.
12. Celik F, Selcuk MA, Kilinc SG, et al. (2024). Molecular discrimination of G1 and G3 genotypes of Echinococcus granulosus sensu stricto obtained from human, cattle, and sheep using the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 marker. *Acta Trop.*, 252:107124.
13. Simsek S, Balkaya I, Ciftci AT, Utuk AE (2011). Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of Echinococcus granulosus by SSCP and conventional PZR in Turkey. *Vet Parasitol.*, 178(3-4):367-369.
14. Gulija TK, Ivancic-Jelecki J, Santak M, Forcic D (2011). Comparative analysis of CE-SSCP to standard RFLP-CE-FLA method in quantification of known viral variants within an RNA virus quasispecies. *Electrophoresis.*, 32(14):1852-1859.

15. **Jabbar A, Gasser RB (2013).** Mutation scanning analysis of genetic variation within and among *Echinococcus* species: implications and future prospects. *Electrophoresis.*, 34(13):1852-1862.
16. **Gasser RB, Hu M, Chilton NB, et al. (2006).** Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc.*, 1(6):3121-3128.
17. **Gasser RB (2006).** Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol.*, 136(2):69-89.
18. **Gasser RB (2013).** A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Vet Parasitol.*, 193(4):353-364.
19. **Hashim HO, Al-Shuhaib MBS (2019).** Exploring the potential and limitations of PZR-RFLP and PZR-SSCP for SNP detection: A review. *J Appl Biotechnol Rep.*, 6(4):137-144.
20. **Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.*, 32(2):314-331.
21. **Zhang L, Gasser RB, Zhu X, McManus DP (1999).** Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 93(3):329-334.
22. **Oudni-M'rad M, Cabaret J, M'rad S, et al. (2006).** Genetic differences between Tunisian camel and sheep strains of the cestode *Echinococcus granulosus* revealed by SSCP. *Parasite.*, 13(2):131-136.

Using the MTT Cell Viability Test and Immunocytochemistry Techniques, Benzimidazole's Cytotoxicity and Apoptosis Activation in Mouse 4T1 Cell Culture

Esra BİLİCİ^{1,a,*}, Büşra GÜLBENLİ TÜRKOĞLU^{2,b}, Senem AKKOÇ^{3,c}

¹Laborant and Veterinary Health Program, Eşme Vocational School, Uşak University, Uşak, TÜRKİYE

²Department of Pathology, Health Sciences Institute, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, TÜRKİYE

³Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Suleyman Demirel University, Isparta, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0001-6636-5975, ^b0000-0001-6666-8992, ^c0000-0002-1260-9425

✉ Corresponding Author

Esra BİLİCİ

Laborant and Veterinary Health
Program, Eşme Vocational School,
Uşak University, Uşak, TÜRKİYE

esra.bilici@usak.edu.tr

Received

26.03.2025

Accepted

20.05.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1666352

How to cite: Bilici E, Türkoğlu BG, Akkoç S (2025). Using the MTT Cell Viability Test and Immunocytochemistry Techniques, Benzimidazole's Cytotoxicity and Apoptosis Activation in Mouse 4T1 Cell Culture. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):33-37.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

Cancer is known as a major health problem globally. Breast cancer is the most common malignant tumor and metastasis continues to be the main cause of poor prognosis. Despite recent advances in cancer treatment, the success of metastatic breast cancer treatment is not at the desired level. Among the anticancer drugs discovered in recent years, various benzimidazole derivatives have attracted attention in the development of anticancer agents due to their various biological activities and clinical applications. The aim of this study was to evaluate the antiproliferative activity of synthesized benzimidazole derivative SA-61 in 4T1 breast cancer cell line in comparison with abemaciclib, which is approved by FDA for the treatment of breast cancer. The antiproliferative activity and apoptotic effect of SA-61 were examined using MTT and immunohistochemical methods, respectively. According to MTT results, compound SA-61 showed antiproliferative activity in 4T1 cells in a dose-dependent manner, but this effect was lower than abemaciclib. Although further studies are needed to specifically identify the compounds involved in its anti-cancer activity, our findings suggest that SA-61 inhibits the proliferation of 4T1 cells and its effect is dose dependent.

Key Words: Benzimidazole, Casp-3, cytotoxic activity, 4T1 cell line

Benzimidazolün Fare 4T1 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması

Öz

Kanser, küresel olarak önemli bir sağlık sorunu olarak bilinmektedir. Meme kanseri en yaygın kötü huylu tümördür ve metastaz kötü prognozun başlıca nedeni olmaya devam etmektedir. Son yıllarda kanser tedavisindeki gelişmelere rağmen, metastatik meme kanseri tedavisinin başarısı istenen düzeyde değildir. Son yıllarda keşfedilen antikanser ilaçları arasında, çeşitli biyolojik aktiviteleri ve klinik uygulamaları nedeniyle çeşitli benzimidazol türevleri antikanser ajanı geliştirmede dikkat çekmiştir. Bu çalışmanın amacı, 4T1 meme kanseri hücre hattında, sentezlenen benzimidazol türevi olan SA-61'in antiproliferatif aktivitesini, FDA tarafından meme kanseri tedavisi için onaylanan abemaciclib ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir. SA-61'in antiproliferatif aktivitesi ve apoptotik etkisi sırasıyla MTT ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelendi. MTT sonuçlarına göre SA-61 bileşiği 4T1 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde antiproliferatif aktivite gösterdi fakat bu etki abemaciclibe kıyasla daha düşüktür. Kanser karşıtı aktivitesinde rol oynayan bileşiklerin spesifik olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmasına rağmen, bulgularımız SA-61'in 4T1 hücrelerinin çoğalmasını engellediğini ve etkisinin doza bağlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Benzimidazol, Casp-3, sitotoksik aktivite, 4T1 hücre hattı

INTRODUCTION

In terms of both prevalence and cancer-related death among women, breast cancer is the most common cancer diagnosed globally (1). There is currently no accurate way to forecast the development of metastatic lesions, and current treatments for metastatic breast cancer are unsuccessful. Finding novel biomarkers and treatment targets for breast cancer requires a deeper comprehension of the processes behind breast cancer metastasis (2). A mouse initial breast tumor that developed in a BALB/c mouse raised and breastfed by a C3H female mouse is a subclone of 4T1 breast cancer, a triple-negative subtype of breast cancer (3). 4T1 cells are diverse clonal subpopulations with unique shape, behavior, and gene expression profiles, in contrast to previous cancer models (4). Even though some patients may not respond completely to chemotherapy, it is still the cornerstone of treatment for triple-negative breast cancer because the therapeutic targets are unknown (5). Thus, it is imperative to find a possible target for triple-negative breast cancer treatment.

Because of their varied biological activity and therapeutic uses, several benzimidazole derivatives have garnered interest in the creation of anticancer agents among the anticancer medications found in recent years (6). Benzimidazole is a great scaffold for the creation of anticancer drugs because of its distinct core structure and low toxicity. Because of their structural resemblance to nucleosides, benzimidazole and its derivatives exhibit potent anticancer action (7). Furthermore, benzimidazoles can bind to many pharmacological targets implicated in the advancement of cancer and function as hydrogen donors or acceptors. In the literature, there are numerous anticancer medications with benzimidazole cores that have garnered a lot of interest (Figure 1).

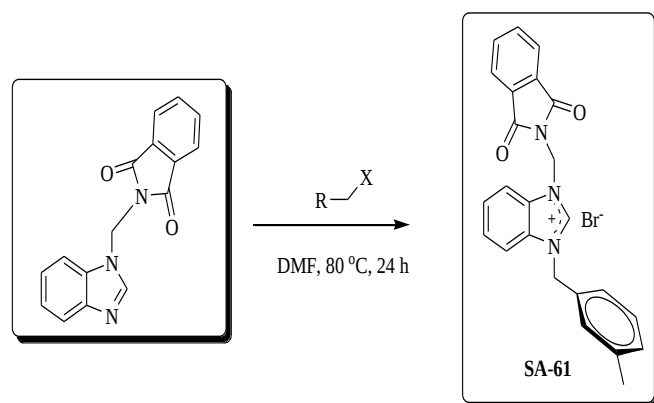


Figure 1. Synthesis of a compound including benzimidazole core, SA-61.

Abemaciclib works well against a variety of solid tumors, such as melanoma, liposarcoma, esophageal and non-small cell lung cancers, and breast carcinoma. Abemaciclib is presently undergoing clinical trials for additional solid tumors and has FDA approval for the treatment of breast cancer (8). Abemaciclib's capacity to suppress growth *in vitro* and *in vivo* provides justification for its use (9). In light of this, the current work sought to compare the cytotoxic effect and apoptosis activation of SA-61, a benzimidazole derivative, to Abemaciclib in the 4T1 mouse breast cancer cell line.

MATERIAL AND METHODS

General Synthesis of 1-(N-Phthalimidomethyl)-3-(3-methylbenzyl) benzimidazolium Bromide, SA-61

A solution of benzimidazole (1 mmol) and potassium hydroxide (1 mmol) was prepared in 60 mL of ethanol. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour, after which 3-methylbenzyl chloride (1 mmol) was gradually added. The solution was then refluxed for 6 hours and allowed to cool to room temperature. The resulting potassium chloride precipitate was removed by filtration, and the solvent was evaporated. The intermediate product, 1-(3-methylbenzyl) benzimidazole, was recrystallized, washed multiple times with diethyl ether, and dried under vacuum. Next, 1-(3-methylbenzyl) benzimidazole (1.29 g, 1 mmol) was dissolved in 4 mL of dried DMF, and N-(bromomethyl) phthalimide (1.39 g, 1 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 24 hours under an argon atmosphere. Upon completion, DMF was removed under reduced pressure, and 15 mL of diethyl ether was introduced. The solid was collected, washed twice with diethyl ether (2 × 15 mL), and dried under vacuum. Finally, the purified product was crystallized in an ethanol/diethyl ether (3:1) mixture at room temperature, yielding a white solid (10).

4T1 Cells

4T1 breast cancer in mice as previously documented, 4T1 cells were cultivated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 μ M glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 1 mM sodium pyruvate (complete medium). The cells were procured from ATCC, Manassas, VA, USA. There have been prior reports of the production of 4T1 cells (A8) lacking GM-CSF. In T-75 tissue culture flasks, 4T1 cells were cultivated in full media to create 4T1 cell culture supernatant (4T1-sup). Cell-free supernatants were obtained by centrifugation at 1200 rpm for 10 minutes after the medium's color began to become somewhat yellow. Amicon Ultra-15 centrifugal filters were used to concentrate cell-free supernatants.

The Cytotoxic Activity Studies

The process outlined in the literature was followed to conduct cytotoxic activity investigations of compound SA-61 and abemaciclib as a positive control medication (11,12). The 4T1 mouse breast cancer cells (ATCC CRL-2539) were cultivated in RPMI with 1% glutamax and 10% fetal bovine serum (FBS) added. Cells were seeded into sterile 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well. For 48 hours, the cells were exposed to the chemicals at doses of 200, 100, 50, 25, and 12.5 μ M. After adding the MTT stock solution (50 μ L, 5 mg/mL) to the plate wells, the plates were incubated for two more hours. The Promega Elisa plate reader instrument was used to detect absorbance levels at 590 nm. GraphPad Prism Software 5 was used to calculate the IC₅₀ values.

Immunocytochemistry Staining

Prior to cell staining, the cells were incubated in PBS at 37 °C for 15 minutes after the top medium in the culture medium was removed. Following the removal and disposal of the

PBS, the cells were fixed for 30 minutes at 4 °C in 70% ethanol. The coverslips were incubated in a 0.5% H₂O₂ solution made in methanol for 10 minutes after being left in PBS for 10 minutes. They were then rinsed three times for 5 minutes each with distilled water. Following a 30-minute incubation period in 4N HCl, the samples underwent three 5-minute PBS washes. After that, a 20-minute protein block was applied. HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (ImmPRESS® MP-7451) was utilized as the secondary antibody for caspase-3 detection, whereas Cleaved Caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling, 9661) was employed as the primary antibody at a 1:400 dilution. Following washing, coverslips were counterstained with Mayer hematoxylin and treated for equal amounts of time with DAB chromogen. They were successively exposed to increasing concentrations of alcohol (50, 80, and 100 percent) before being allowed to dry. Lastly, entellan mounting on slides prepared the preparations for analysis. Cells were examined for immunopositivity at 40× magnification (bar 20 µm) in order to assess the staining.

RESULTS

Cytotoxic activity studies of benzimidazole SA-61 were evaluated against the mouse breast cancer cell line 4T1. For comparative purposes, the cytotoxicity of abemaciclib (a targeted anticancer drug used in the treatment of advanced or metastatic breast cancer) was evaluated under the same conditions. The MTT assay was used in cell culture studies to determine the relationship between cell viability under various treatments. Compounds were evaluated for their potential anticancer activity using the IC₅₀ value, which is the dose of the molecule that caused a 50% decrease in survival as determined by the MTT assay. The results of the viability rates of 4T1 cells cultured with abemaciclib and SA-61 are given in Chart 1. Accordingly, when different concentrations of abemaciclib (12.5, 25, 50, 100, 200 µM) and SA-61 (12.5, 25, 50, 100, 200 µM) were applied to 4T1 cells for 48 hours, it was determined that the IC₅₀ dose reached corresponded to the dose required to kill half of the cells (Table 1). SA-61 showed an IC₅₀ value of 98.25 µM against 4T1 cell line. This result indicates that SA-61 shows moderate anticancer activity in 4T1 cells. Abemaciclib showed an IC₅₀ value of 14.84 µM against 4T1 cell line. This result revealed that abemaciclib showed a higher anticancer effect compared to SA-61 in 4T1 cells. Abemaciclib exhibited a more potent anticancer profile compared to SA-61 by showing a lower IC₅₀ value in

the 4T1 cell line. This lower value indicates that SA-61 is less effective in 4T1 cells and has less potential to inhibit breast cancer cells. Cellular proliferation was measured for mouse breast cancer 4T1 cells. Mouse breast cancer cells exposed to various concentrations of SA-61 and abemaciclib were observed at the 48-h time point. Significant differences were detected in 4T1 cells treated with different concentrations of SA-61 and abemaciclib. It was found that SA-61 had the highest antiproliferative effect at a concentration of 200 µM. Significant differences were also observed for abemaciclib in terms of cytotoxic effects caused by the doses. It is seen in Figure 2 that abemaciclib significantly inhibited the growth of 4T1 cells at concentrations of 200, 100 and 50 µM.

Chart 1. Cell viability ratio depending on concentrations of compound SA-61 and abemaciclib

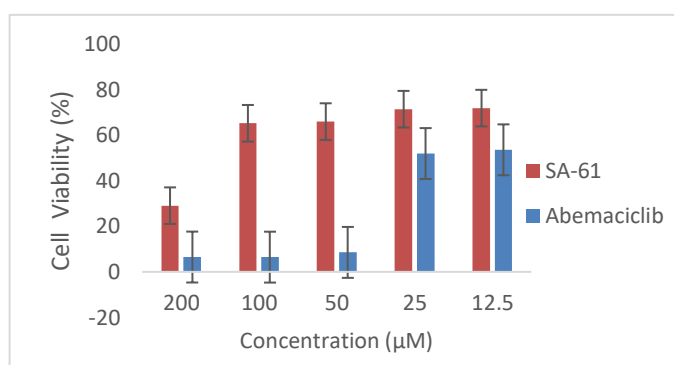


Table 1. IC₅₀ results for compounds against mice cancer cell line

Compounds	IC ₅₀ (µM)
4T1	
SA-61	98.25
Abemaciclib	14.84

4T1 mouse mammary tumor cells were treated with SA-61 for 48 hours in order to investigate the apoptotic effects of the substance. Immunocytochemical staining was utilized to evaluate alterations in caspase-3 enzyme activity. 4T1 mouse mammary tumor cells showed increased caspase-3 activity in response to 48 hours of incubation with 98.25 µM SA-61, a 50% growth suppression dosage, as compared to untreated cells (Figure 2). These results imply a possible link between SA-61-induced apoptosis and caspase-3 activation.

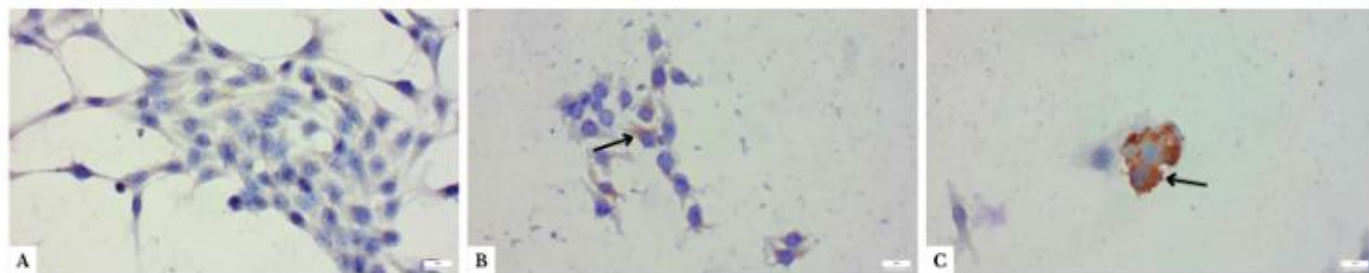


Figure 2. Immunoreaction of 4T1 mouse mammary tumor cells with cleaved-caspase3 antibody. A. Control (untreated) B. Abemaciclib (IC₅₀) C. SA-61 (IC₅₀). Nuclei are stained blue, positive cells are stained brown (arrow). Bar: 20 µm.

DISCUSSION AND CONCLUSION

With a high number of new cases and the second-highest number of fatalities, breast cancer continues to be a major cause of morbidity and mortality among women despite advancements in detection and treatment (13,14). Chemotherapy, surgical resection, and radiation therapy are common treatment approaches for primary breast cancer; however, metastatic breast cancer presents a considerable challenge and is a major cause of cancer-related mortality (15). Surgery, chemotherapy, radiation, endocrine therapy, targeted therapy, and other similar methods are considered conventional therapies for breast cancer (16).

Abemaciclib is a suitable option because it can cause atypical cell death and may also encourage autophagy and apoptosis. Abemaciclib employs H⁺ transport to cause lysosomal acidification. Through a distinct molecular mechanism, the impact on V-ATPase seems to result in lysosomal malfunction and ultimately cell death, as well as lysosomal growth brought on by H₂O influx (17). Abemaciclib has been shown to induce this type of cell death phenotype in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells, A549 non-small lung carcinoma cells, and prostate cancer cells (18).

Although caspases are involved in apoptosis, prior research has discovered that caspase-3 is also involved in the autophagic process (19). In human apoptotic endothelial cells under nutritional deprivation, caspase-3 reoriented autophagic vacuoles toward the cell membrane, promoting their extracellular transit (20). Apoptotic volume decrease, a geometric predictor of cell disintegration into apoptotic bodies, may be influenced by the transit of these massive autophagic vacuoles (18). These results imply that caspase-3 is a node that controls how the apoptotic and autophagic pathways interact (20).

Benzimidazole compound had potent apoptotic effects in 4T1 cells, according to our investigation. Although the control group did not exhibit caspase-3 staining, cells treated with abemaciclib, which served as a positive control, only mildly and sparingly showed favorable results. On the other hand, cells treated with benzimidazole compound showed strong caspase-3 positivity, suggesting a substantial apoptotic response. This result is in line with earlier research that demonstrated that DMDD increases caspase-3 and -9 activation to start the apoptotic process (21). Similarly, it is recognized that natural substances like resveratrol and piperine have anticancer effects via apoptotic processes. Piperine inhibits cell proliferation by inducing cell cycle arrest in the G2/M phase and initiates apoptosis through caspase-3 activation. However, by stopping cells in the S phase, resveratrol exhibits lethal effects on cancer cells (22, 23). Furthermore, it has been demonstrated that CQ triggers cell death by activating caspase-9 and caspase-3 and activates the mitochondrial apoptotic pathway, which results in the release of cytochrome c (24). According to these findings, benzimidazole derivatives can also encourage the death of tumor cells by apoptosis and could be used as a possible anticancer medication.

FINANCIAL SUPPORT

"There was no funding from any organization to conduct this research."

CONFLICT OF INTEREST

"There is no conflict of interest to be declared by the authors."

AUTHOR CONTRIBUTIONS

"All analyses, writing and final checks of the study were performed equally among the authors."

ETHICAL STATEMENT

"There is no need for an ethics committee in the study."

REFERENCES

1. Choi HS, Ko YS, Jin H, et al. (2022). Mebendazole increases anticancer activity of radiotherapy in radiotherapy-resistant triple-negative breast cancer cells by enhancing natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 7;23(24):15493.
2. Medeiros B, Allan AL (2019). Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: clinical and experimental perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 20:2272.
3. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc Immunol.* 39:20.2.1–20.2.16.
4. Wagenblast E, Soto M, Gutiérrez-Ángel S, et al. (2015). A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. *Nature.* 520:358–362.
5. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol.* 13:674–690.
6. Lee YT, Tan YJ, Oon CE (2023). Benzimidazole and its derivatives as cancer therapeutics: The potential role from traditional to precision medicine. *Acta Pharm Sin B.* 13(2):478–497.
7. Hagar FF, Abbas SH, Atef E, Abdelhamid D, Abdel-Aziz M (2025). Benzimidazole scaffold as a potent anticancer agent with different mechanisms of action (2016–2023). *Mol Divers.* 29(2):1821–1849.
8. Liu Y (2021). Abemaciclib sensitizes HPV-negative cervical cancer to chemotherapy via specifically suppressing CDK4/6-Rb-E2F and mTOR pathways. *Fundam Clin Pharmacol.* 35(1):156–64.
9. Schettini F (2018). CDK 4/6 inhibitors as single agent in advanced solid tumors. *Front Oncol.* 8:608.
10. Akkoç S, Gök Y, İlhan İÖ, Kayser V (2016). N-Methylphthalimide-substituted benzimidazolium salts and PEPSI Pd–NHC complexes: synthesis, characterization and catalytic activity in carbon–carbon bond-forming reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* 12, 81–88.
11. Bilici E, Akkoç S (2025). Investigation of the cytotoxic effect of a new n-phenyl benzimidazole derivative on cell viability in A549 and HepG2 cell lines. *Van Med J.* 32(1), 3–6.
12. Mavvaji M, Zeyrek CT, Akkoc S (2024). Investigation of the cytotoxic activity, DFT calculation, and docking studies newly synthesized 1,3-disubstituted benzimidazolium chlorides on human liver cancer, lung cancer, and normal embryonic kidney cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 741:151024.
13. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 73(1):17–48.
14. Xia CF, Dong XS, Li H, et al. (2022). Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chinese Medical Journal.* 135(5):584–590.

15. **Park M, Kim D, Ko S, et al. (2022).** Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Int J Mol Sci.* 23(12):6806.
16. **Waks AG, Winer EP (2019).** Breast cancer treatment: a review. *JAMA*, 321, 288–300.
17. **Alian DME, Helmy MW, Haroun M, Moussa N (2024).** Modulation of autophagy and apoptosis can contribute to the anticancer effect of Abemaciclib/Celecoxib combination in colon cancer cells. *Med Oncol.* 3;41(2):43.
18. **Hino H (2020).** Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes. *Cancer Sci.* 111(6):2132–45.
19. **Sadasivan S (2006).** Amino acid Starvation induced autophagic cell death in PC-12 cells: evidence for activation of caspase-3 but not calpain-1. *Apoptosis.* 11(9):1573–82
20. **Sirois I (2012).** Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy.* 8(6):927–37.
21. **Chen C, Nong Z, Xie Q, et al. (2017).** 2-Dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione inhibits the growth and metastasis of breast carcinoma in mice. *Scientific reports*, 7(1), 6704.
22. **Lai LH, Fu QH, Liu Y, et al. (2012).** Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacol Sin.*, 33(4), 523-530.
23. **Wu H, Chen L, Zhu F, Han X, Sun L, Chen K. (2019).** The cytotoxicity effect of resveratrol: cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins*, 11(12), 731.
24. **Jiang PD, Zhao YL, Deng XQ, et al. (2010).** Antitumor and anti-metastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomed Pharmacother.*, 64(9), 609-614.

Elazığ'da Satılan Cevizli Sucuğun (Orcik) Toplam Aflatoksin Düzeyinin Araştırılması

Pelin DEMİR^{1,a,✉}, Fatma Nur ŞENOCAK^{1,b}, Yasin BAYKALIR^{2,c}, Ali ARSLAN^{1,d}

¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE

²Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Balıkesir, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0002-0824-1672^a, 0009-0007-0917-6634^b, 0000-0002-9248-6065^c, 0000-0002-3011-5592^d

✉ Corresponding Author

Pelin DEMİR

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim
Dalı, Elazığ, TÜRKİYE

p.demir@firat.edu.tr

Received

10.09.2024

Accepted

20.05.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1547278

How to cite: Demir P, Şenocak FN, Baykalır Y, Arslan A (2025). Elazığ'da Satılan Cevizli Sucuğun (Orcik) Toplam Aflatoksin Düzeyinin Araştırılması. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):38-41

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Öz

Bu araştırma Elazığ'da satışa sunulan cevizli sucuğun (orcik) toplam aflatoksin (AF) düzeyini saptamak amacıyla yapıldı. Çalışmada, toplam 50 adet orcik örneği (10 adet üzüm, 10 adet dut, 10 adet kayısı, 10 adet nar, 10 adet kivi) incelendi. Aflatoksin tayininde 8031 Veratox® HS Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test, total aflatoksin kiti ve yüksek kaliteli monokromatör bazlı UV/VIS spektrofotometre kullanıldı. İncelenen orcik örneklerinde ortalama olarak toplam aflatoksin değerleri üzüm örneklerinde 1.629±0.072 µg/kg, dut örneklerinde 1.149±0.163 µg/kg, kayısı örneklerinde 1.086±0.132 µg/kg, nar örneklerinde 1.387±0.095 µg/kg, kivi örneklerinde 1.443±0.095 µg/kg olarak belirlendi. En yüksek aflatoksin değeri üzüm orcğinde (2.040 µg/kg), en düşük aflatoksin değeri ise dut orcğinde (0.140 µg/kg) saptandı. Tüm orcik örneklerinin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde bildirilen maksimum limitlerin altında olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, analizleri yapılan orcik örnekleri incelendiğinde belirlenen toplam aflatoksin (AF) düzeyleri bakımından üretimde bir standart olmadığı, gerek üretiminde gerekse satışa sunulmasında gerekli hijyen şartlarına uyulmadığı belirlendi. Üretim ve satış ortamlarındaki hijyen kurallarına uyulması, ürünlerin uygun ambalaj içerisinde paketlenip satışa sunulması orcik ürünlerinin mikotoksinlerden arı olması ve halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, cevizli sucuk, geleneksel ürün, halk sağlığı, UV/VIS spektrofotometre

Investigation of Total Aflatoxin Level of Walnut Sausage (Orcik) Sold in Elazığ

Abstract

This study was conducted to determine the total aflatoxin (AF) level of walnut sausage (orcik) sold in Elazığ. In the study, a total of 50 orcik samples (10 grapes, 10 mulberries, 10 apricots, 10 pomegranates, 10 kiwis) were examined. 031 Veratox® HS Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test, total aflatoxin kit, and high-quality monochromator-based UV/VIS spectrophotometer were used for the determination of aflatoxin. The average total aflatoxin values in the examined orcik samples were determined as 1.629±0.072 µg/kg in grape samples, 1.149±0.163 µg/kg in mulberry samples, 1.086±0.132 µg/kg in apricot samples, 1.387±0.095 µg/kg in pomegranate samples and 1.443±0.095 µg/kg in kiwi samples. The highest aflatoxin value was detected in grape orcik (2.040 µg/kg), while the lowest was in mulberry orcik (0.140 µg/kg). It was determined that all orcik samples were below the maximum limits reported in the Turkish Food Codex Contaminants Regulation. As a result, when the analyzed orcik samples were examined, it was determined that there was no standard in production in terms of total aflatoxin (AF) levels and that the necessary hygiene conditions were not followed both in production and in sales. Compliance with hygiene rules in production and sales environments, and packaging products in appropriate packaging and sales are important for orcik products to be free of mycotoxins and public health.

Key Words: Aflatoxin, public health, traditional product, UV/VIS spectrophotometer, walnut sausage

GİRİŞ

En popüler Türk tatlıları arasında olan orcik, genellikle üzüm ve dut meyvesinden üretilmektedir. Orcik karbonhidratlar, antioksidanlar, diyet lifleri, vitaminler ve mineraller gibi zengin ve yüksek besin içeriğine sahip lezzetli ve iştah açıcı olan bir atıştırma ürünüdür. Ancak son zamanlarda Türkiye'de şeker pancarı pekmezinden üretilmeye başlanmıştır (1-4).

Gümüşhane yöresinde daha çok "köme" ismi ile bilinen orcik, doğu illerinde genellikle bandırma, cevizli sucuk, kedi bacağı, Maraş sucuğu, orjik veya orcik, sucuk, şeker sucuk " olarak bilinmektedir. Sucuk; genellikle taze üzüm şirasının veya şekerle karışık üzüm şirasının nişasta ile usulüne uygun olarak kaynatılmasıyla hazırlanan, peltesine ipliklere dizilmiş badem, ceviz, fındık veya fıstık gibi yemişlerin defalarca batırılıp kurutulmasıyla elde edilen bir üründür. Dünya genelinde de mevcut olan ve kuzey ülkelerinde çörçkela (churchkhela) ismiyle anılan geleneksel ürünler, erik, incir, kayısı gibi meyvelerden oluşan bir karışıma ipe dizili badem, ceviz, fındık gibi yemişlerin batırılıp kurutulması ile elde edilmektedir (5-7).

Anadolu kültürüne ait olan "köme"nin, tarihinin yıllar öncesine dayandığı ilk olarak hangi tarihte yapıldığı kesin bilinmemektedir. Tarihi kayıtlara göre Osmanlı döneminde Gümüşhane ilinin Torul ilçesinin Harmancık köyünde Rumlar tarafından köme ve/veya pestilin yapıldığı belirtilmektedir. Rumlar 1926 yılında bu bölgeden göç etmiş ve bu bölgeye yerleşen Türkler aynı kültürü devam ettirmişlerdir (5).

Günümüzde geleneksel ve endüstriyel olarak farklı üretim metotları olan cevizli sucuğun ülkemizde Elazığ, Malatya, Erzurum, Erzincan, Artvin, Gümüşhane illerinde üretimi yapılan ve artan üretim talebiyle hem yurt içi hem de yurt dışı pazarında önemli bir ticaret kaynağı olmuştur. Ülkemizde orcikle ilgili sınırlı sayıda çalışma (3,6,8-9) mevcuttur.

Mikotoksinler hem insanlar hem de hayvanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açan ve küfler tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir (10-11). Mikotoksinler, üreten mantarın türüne, kimyasal yapılarına, etki ettikleri organ, doku ve sistemlere göre gruplandırılmaktadır (12-13). Aflatoksinler (AF'ler) *Alternaria* spp., *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* gibi küfler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleri olan mikotoksinler olup B1, B2, G1 ve G2 olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (6,14-17).

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde (18) aflatoksin düzeyleri sert kabuklu meyvelerde son tüketici için piyasaya arz edilmeden veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olanlar için maksimum B1 AF için düzeyi 8 µg/kg, toplam AF düzeyi (B1, B2, G1, G2) maksimum 15 µg/kg; sert kabuklu meyvelerde son tüketici için piyasaya arz edilenler veya gıda bileşeni olarak kullanılanlarda maksimum B1 AF için düzeyi 5 µg/kg, toplam AF düzeyi (B1, B2, G1, G2) maksimum 10 µg/kg miktarında olmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gıdalarda tolere edilebilecek AF düzeyini 30 ppb olarak bildirmişlerdir. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi ise (FDA) gıdalarda aflatoksin miktarını 20 ppb güvenli düzey olarak belirtmiştir (17,19).

Literatürde orcik ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda Elazığ ilindeki orciklerin kimyasal ve mikrobiyolojik kalite parametreleri (4) ve ağır metal düzeyleri (9) araştırılmış, ancak aflatoksinler ile ilgili

herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu araştırma Elazığ'da satışa sunulan cevizli sucuğun (orcik) toplam aflatoksin (AF) düzeyini saptamak amacıyla yapıldı.

MATERYAL VE METOT

Orcik Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan cevizli sucuk (orcik) örnekleri Elazığ ili merkezindeki kapalı çarşı, market, dükkân ve semt pazarlarından temin edildi. Farklı satış noktalarından ve her bir işletmeden ayrı ayrı alınan toplam 50 adet orcik örneği (10 adet üzüm, 10 adet dut, 10 adet kayısı, 10 adet nar, 10 adet kivi) materyal olarak kullanıldı.

Toplam Aflatoksin Analizleri

Örnekler numune poşetleri içerisine alınarak soğuk zincir altında toplam aflatoksin analizinin yapıldığı Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜB-TAM)'ne getirildi. Aflatoksin tayininde 8031 Veratox® HS Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test (Neogen, USA) total aflatoksin kiti ve yüksek kaliteli monokromatör bazlı UV/VIS spektrofotometre (Multiskan GO Seri No: 1510-02102C, Thermo, ABD) kullanıldı.

Numune Hazırlama ve Ekstraksiyon

1. Neogen'in hazırlanmış solusyonu veya test edilecek her numune için 7 kısım ACS Grade metanol ile 3 kısım distile ve deiyonize su karıştırarak %70'lik metanol solusyonu hazırlandı.
2. Temsili bir numune alınarak, öğütülmüş malzemenin en az %75'i ince bir hazır kahvenin parçacık boyutu olan 20 gözlü bir elekten geçecek şekilde numunenin tamamı öğütüldü.
3. 25 gram öğütülmüş numune 125 mL %70 metanol ile 2 dakika yüksek hızlı bir karıştırıcıda karıştırıldı. Alternatif yöntem: 25 mL %70 metanole 5 gram öğütülmüş numune eklendi ve 3 dakika kuvvetlice çalkalandı.
4. En az 5 mL'yi Whatmann (No: 1) filtre kağıdından (veya Neogen filtre şırıngasından) geçirerek süzüldü.
5. Süzüntü test için hazır hale getirildi.

Test Prosedürü

1. Kırmızı işaretli karıştırma kuyularına 100 µL konjugat eklendi.
2. Kırmızı işaretli karıştırma kuyularına 100 µL kontrol ve numune eklendi.
3. Karıştırılarak 100 µL'yi antikor kuyularına aktarıldı ve 10 dakika boyunca inkübe edildi.
4. Antikor kuyularından sıvı boşaltıldı.
5. Deiyonize su ile kuyular 5 kez iyice yıkandı.
6. Suyu emici bir havluya hafifçe vurularak fazla su dışarı aktarıldı.
7. 12 kanallı pipet kullanarak 100 µL substrat, reaktif teknesinden antikor kuyularına aktarıldı ve 10 dakika inkübe edildi.
8. Reaktif teknesinden antikor kuyularına 100 µL Red Stop aktarıldı.
9. 650 nm filtreli bir mikro kuyu okuyucu ile sonuçlar okundu.

İstatistiksel Analizler

Çalışmada analizi yapılan cevizli sucuk örneklerinin tanımlayıcı istatistikleri ve değerler arasındaki ilişkiler SPSS22 (IBM SPSS, IBM Corporation, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler varyans analizine (One-Way ANOVA) tabi tutuldu. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde Tukey testi uygulandı. İstatistiksel önemlilik $P \leq 0,05$ olduğunda kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi (20).

BULGULAR

Orcik örneklerine ait analizlerine ait absorbans değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Aflatoksin değerleri üzüm orciğinde 1.140-2.040 $\mu\text{g/kg}$, dut orciğinde 0.140-1.580 $\mu\text{g/kg}$, kayısı orciğinde 0.670-1.800 $\mu\text{g/kg}$, nar orciğinde 1.030-1.960 $\mu\text{g/kg}$ ve kivi orciğinde 1.100-1.960 $\mu\text{g/kg}$ düzeylerinde tespit edildi. Orcik örnekleri (üzüm, dut, kayısı, nar, kivi) arasında aflatoksin absorbans değerleri açısından farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0.05$). En yüksek aflatoksin değeri üzüm orciğinde en düşük aflatoksin değeri ise dut orciğinde belirlendi. Tüm orcik örneklerinde elde edilen aflatoksin değerlerinin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde (18) bildirilen maksimum limitlerin altında olduğu tespit edildi.

Tablo 1. Orcik örneklerinde saptanan aflatoksin değerleri (ortalama $\pm$ standart hata) ($\mu\text{g/kg}$)

Örnek Grubu	En az	En çok	Ortalama $\pm$ standart hata
Üzüm	1.140	2.040	1.629 $\pm$ 0.072 ^a
Dut	0.140	1.580	1.149 $\pm$ 0.163 ^b
Kayısı	0.670	1.800	1.086 $\pm$ 0.132 ^b
Nar	1.030	1.960	1.387 $\pm$ 0.095 ^{ab}
Kivi	1.100	1.960	1.443 $\pm$ 0.095 ^{ab}
Tablo F değeri	3.683		
P değeri	<0.05		

a, b: Gruplar arası farklılıkları göstermektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Aflatoksin değerleri ortalama olarak üzüm orciğinde 1.629 $\pm$ 0.072 $\mu\text{g/kg}$, dut orciğinde 1.629 $\pm$ 0.072 $\mu\text{g/kg}$, kayısı orciğinde 1.086 $\pm$ 0.132 $\mu\text{g/kg}$, nar orciğinde 1.387 $\pm$ 0.095 $\mu\text{g/kg}$ ve kivi orciğinde 1.443 $\pm$ 0.095 $\mu\text{g/kg}$ düzeylerinde tespit edildi. Orcik örnekleri (üzüm, dut, kayısı, nar, kivi) arasında aflatoksin absorbans değerleri açısından farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0.05$). Konu ile ilgili yapılan çalışmalar (21,22) incelendiğinde tespit edilen aflatoksin düzeyleri TGK'de belirlenen limitlerin altında olduğu ve bu açıdan mevcut çalışmamızla benzerlik gösterdiği belirlendi.

Yıldız ve Boyracı (3) yaptıkları çalışmada Gümüşhane ilinde kömelerde total aflatoksin (B_1, B_2, G_1, G_2) ve aflatoksin B_1 (AFB_1) düzeylerini incelemişler ve aflatoksin belirlememişlerdir (0.00 $\mu\text{g/kg}$). Erdoğan vd., (21) Erzurum'dan (11 adet), Gümüşhane'den (4 adet), Elazığ'dan (3 adet) olmak üzere toplam 18 adet köme incelemişlerdir. İncelenen örneklerin 8'inde 1.8-13.2 $\mu\text{g/kg}$ arasında aflatoksin saptamışlardır.

Başka bir çalışmada (22) 48 adet köme örneğinin 21 tanesinde (%43.8) 0.58-15.20 $\mu\text{g/kg}$ arasında ve ortalama 2.97 $\mu\text{g/kg}$ total aflatoksin (B_1, B_2, G_1, G_2) belirlemişlerdir. Aynı çalışmada en toksik olan AFB_1 tüm örneklerde ve 11.80 $\mu\text{g/kg}$ düzeyinde, AFB_2 örneklerin %33.3'ünde ve 0.20-3.34 $\mu\text{g/kg}$ düzeyinde, AFG_1 : 0.82-1.84 $\mu\text{g/kg}$ düzeyinde ve AFG_2 : 0.00-0.31 $\mu\text{g/kg}$ düzeyinde tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular değerlendirildiğinde tüm orcik örneklerinde toplam aflatoksin (AF) belirlenmiş ancak tespit edilen AF düzeylerinin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde bildirilen maksimum limitlerin altında olduğu tespit edildi. Orcik üretiminde ürüne katılan ceviz gibi çeşnilerin uygun ortamda muhafaza edilmesi, üretim ve satış hijyen kurallarına riayet edilmesi, ürünlerin uygun ambalaj materyalleri içerisinde paketlenip satışa sunulması standart bir üretim ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma "European Conferences 6th International Conference on Health, Engineering and Applied Sciences Eu Exart 5th International Group Exhibition 17-20 October 2024/Belgrade" kongresinde özet bildiri olarak sunulmuştur.

Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca proje analizlerinin yürütülmesinde desteklerinden ötürü Prof. Dr. Duygu Neval SAYIN İPEK hocamıza teşekkürü bir borç biliriz.

FİNANSAL BEYAN

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1919B012216953 Numaralı proje ile finanse edilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar tarafından beyan edilecek bir çıkar çatışması yoktur

YAZAR KATKILARI

PD çalışmanın planlanmasında görev aldı. Örneklerin toplanması PD ve FNŞ tarafından yapıldı. İstatistiksel analizler YB tarafından yapıldı. Çalışmanın yazılması ve son kontrolleri PD, FNŞ, YB ve AA katkılarıyla gerçekleştirildi.

ETİK BEYAN

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.05.2023 tarihli ve 2023/06-20 protokol numaralı onayı ile Elazığ ilinde yürütüldü.

KAYNAKLAR

1. Chen Y, Martynenko A (2018). Combination of hydrothermodynamic (HTD) processing and different drying methods for natural blueberry leather. *LWT*, 87:470-477.
2. Suna S, Ozkan-Karabacak A (2019). Investigation of drying kinetics and physicochemical properties of mulberry leather (pestil) dried with different methods. *JFPP*, 43(8):e14051.
3. Yıldız O, Boyracı GM (2020). Production and some quality parameters of sugar beet sweets (pestil and köme). *Sugar Tech*, 22(5):842-852.

4. **Demir P, Güran HŞ, İncili GK, Patır B (2023).** Elazığ yöresel ürünlerinden cevizli sucuğun (orcik) kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.*, 37(1):13-20.
5. **Kalkışım Ö, Özdemir M (2012).** Pestil ve Köme Teknolojisi. Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane Meslek Yüksekokulu, Ziraat Mühendisliği Anabilim Dalı. 80s, Gümüşhane. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://kutuphane.gumushane.edu.tr/media/uploads/kutuphane/files/pestil_kome.pdf
6. **Ulusal-Bayram H (2018).** Geleneksel Gümüşhane Pestil ve Kömesinin Üretim Yöntemlerinin ve Kalite Parametrelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon. Türkiye.
7. **Doğan N (2019).** Dikenli incir (*Opuntia ficus indica*) meyvesinin bazı fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenerek gıda sanayinde kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye., s.16.
8. **Yıldız O (2009).** Gümüşhane Geleneksel Gıdaları; Pestil, Köme, Ballı Tatlı ve Yeni Bir Ürün: Çokopestil. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Van, Türkiye.
9. **Özmen H, Aksu Y (2012).** Elazığ bölgesinde yetiştirilen üzüm (beyaz ve siyah) ve üzüm ürünlerinde ağır metal tayini. *NWSA*, 7(1):37-42.
10. **Mello JPFD, Macdonald AMC (1997).** Mycotoxins. *AFST*, 69:155-166.
11. **Kızıl M, Demir P, Erkan S, Öksüztepe G (2017).** Elazığ ilinde satılan çiğ süt ve UHT sütlerde aflatoksin M1 düzeyi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, 10(2):115-121.
12. **Tunail N (2000).** Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Sim Matbaacılık, s.3, Ankara, Türkiye.
13. **Seglar B (2001).** Mycotoxin effects on dairy cattle. Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.*, 16(3):497-516.
14. **Özkaya Ş, Temiz A (2003).** Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *On-Line Mikro Derg.*, 1(1):1-21.
15. **Li H, Wang D, Tang X, Zhang W, Zhang Q, Li P (2020).** Time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFICA) for Aflatoxin: aiming at increasing strip method sensitivity. *Front Microbiol.*, 6(11):676.
16. **Tonbak F, Demir P (2021).** Yem ve gıdalarla hayatımıza giren aflatoksinleri önleme yöntemleri. *Vet Farm Toks Dern Bult.*, 12(2):105-117.
17. **Anonim (2023).** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (Tarih: 05.11.2023, Sayı: 32360).
18. **Kaya S, Şanlı Y (2002).** Veterinary Clinical Toxicology. Ankara: Medipress. Sayfa 228-229.
19. **Karagöz Y (2015).** SPSS Uygulamalı İstatistik Yöntemleri, 9. Baskı, Ekin Basım Yayın Dağıtım, Bursa, Türkiye.
20. **Erdoğan A, Gürses M, Sert S (2003).** Erzurum'da satışa sunulan köme (cevizli pestil sucuğu) ve kuru incirlerin aflatoksin içeriklerinin saptanması. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg.*, 34(1):85-88.
21. **Golge O, Hepsag F, Kabak B (2016).** Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method. *Food Control*, 59:731-736.

Prevalence of Infestation, and Risk Factors for *Otodectes cynotis* in Dogs in Kars Region, Türkiye

Nilgün AYDIN^{1,a,✉}, Neslihan ÖLMEZ^{1,b}, Mert SEZER^{2,c}, Enes AKYÜZ^{2,d}, Barış SARI^{1,e}, Gencay Taşkın TAŞÇI^{1,f}, Mesut Erdi IŞIK^{1,g}, Yusuf Umut BATI^{2,h}

¹Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, TÜRKİYE

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, TÜRKİYE

ORCID: ^a 0000-0002-0571-7882, ^b 0000-0002-2191-8924, ^c 0000-0003-1691-7764, ^d 0000-0002-3288-2058, ^e 0000-0001-9978-2513, ^f 0000-0002-8590-1101, ^g 0000-0002-3947-5172, ^h 0000-0001-7528-4376

✉ Corresponding Author

Nilgün AYDIN

Department of Parasitology, Faculty
of Veterinary Medicine, Kafkas
University, Kars, TÜRKİYE

TR-36100 Kars – Türkiye

nlgnetvet.hek@kafkas.edu.tr

Received

10.03.2025

Accepted

20.05.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1633969

How to cite: Aydın N, Ölmez N, Mert Sezer M, Enes Akyüz E, Sari B, Taşçı GT, Işık ME, Batı YU (2025). Prevalence of Infestation, and Risk factors for *Otodectes cynotis* in Dogs in Kars Region, Türkiye. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):42-47.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

In this study, the prevalence of *Otodectes cynotis*, the causative agent of ear manges, was investigated in dogs from the Kars region, Türkiye. As part of the study, the medical histories of 100 dogs of different breeds, sexes, and age groups were recorded, clinical examinations were performed, and samples were collected from the ear canal using a swab for microscopic examination of aural exudates (earwax). Ear mite infestation was detected in 38% (38/100) of the examined dogs. Dogs were categorized based on breed, sex, age, lifestyle, and clinical symptoms, and the relationship between these factors and infestation was statistically evaluated using the chi-square test. As a result of the analysis, the relationship between age, lifestyle, ownership status, and *O. cynotis* infestation was found to be statistically significant ($P<0.05$). The findings reveal the prevalence of ear mite infestation in dogs in the Kars region. The results indicate that otocariasis is more commonly observed in young and stray dogs, with shelter dogs being more prone to this causative agent. Therefore, it has been concluded that hygiene and preventive measures should be emphasized.

Key Words: Dog, otocariasis, *Otodectes cynotis*, prevalence, risk factors

Kars Bölgesindeki Köpeklerde *Otodectes cynotis* Enfestasyonun Yaygınlığı ve Risk Faktörleri

Öz

Bu çalışmada, Kars yöresindeki köpeklerde kulak uyuzuna neden olan *Otodectes cynotis*'in prevalansı ve risk faktörleri araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında, farklı ırk, cinsiyet ve yaş gruplarına ait 100 köpeğin anamnezleri alınmış, klinik muayeneleri yapılmış ve kulak kirlerinden alınan örnekler mikroskopik olarak incelenmiştir. Araştırmada köpeklerin %38'inde (38/100) kulak uyuzu tespit edilmiştir. Köpekler ırk, cinsiyet, yaş, yaşam tarzı ve klinik semptomlar açısından kategorize edilmiş ve ki-kare testi kullanılarak bu faktörlerin enfestasyon ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, yaş, yaşam tarzı ve sahiplik durumu ile *O. cynotis* enfestasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Elde edilen bulgular, Kars bölgesindeki köpeklerde *O. cynotis* enfestasyonunun yaygın olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, otocariasis'in özellikle genç ve sahihsiz köpeklerde daha sık görüldüğünü, barınakta yaşayan köpeklerin bu uyuz etkenine daha yatkın olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, hijyen ve koruyucu tedbirlerin önemsenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, otocariasis, *Otodectes cynotis*, prevalans, risk faktörü

INTRODUCTION

Otodectes cynotis is a mite belonging to the *Otodectes* genus within the Psoroptidae family, and it is widely distributed worldwide. It is primarily known as the causative agent of otodectic mange (ear mite infestation, otocariasis) in cats and dogs (1-4). This mite colonizes the ear canal of dogs, functioning as an obligate ectoparasite that resides without burrowing (5,6). In carnivorous animals, it causes lesions, particularly in the ear region, and is manifested by clinical signs such as otitis externa, ear discharge, and dermatitis around the head, neck, and ears (4,7). Infested animals exhibit severe itching, head shaking, and podal reflexes as common symptoms. Additionally, secondary bacterial infections may lead to the development of purulent inflammations, ear hemorrhages, and torticollis, resulting in serious complications (8). In the later stages of the disease, the lesions may disseminate to the facial region, neck, and limbs. *Otodectes cynotis* is widely distributed both globally and in Türkiye, and has been identified as the causative agent in more than 50% of otitis externa cases. *Otodectes cynotis* mites are primarily transmitted through direct contact between hosts. Host-switching is particularly common during the neonatal period, where close physical contact between the mother and her offspring facilitates the transmission of the parasite (4,9). *Otodectes cynotis* is primarily diagnosed in cats; however, it can also infest dogs, foxes, weasels, and, though rarely, humans. It is also known to possess zoonotic potential (3). *Otodectes cynotis* has been occasionally identified in unusual hosts, including anteaters (10), Patagonian caviars (11), and Southern pudus (12). It is a highly contagious ectoparasite that primarily affects young individuals and is often diagnosed during routine veterinary examinations (13). While *O. cynotis* does not cause significant clinical signs in the early stages of infestation in cats and foxes, it has been reported to lead to severe symptoms at all stages in dogs (14). Given the higher prevalence of *O. cynotis* in cats, it is hypothesized that cats may serve as the primary source of infestations observed in dogs (15).

To date, while retrospective clinical studies have been conducted on ectoparasites found in various animals in the Kars province (16-19) and on dermatological diseases observed in dogs (20), no specific research has been conducted on the presence of *O. cynotis*. That is one of the significant mite pathogens threatening canine health and, due to its zoonotic potential, poses a risk to human health as well (6). It can be transmitted to humans in close contact with cats and dogs, causing dermatological reactions such as temporary itching. Due to the frequent presence of dogs in household environments and their close contact with humans, it is believed that this parasite should also be considered a public health concern. This study was conducted with the aim of determining the presence of *O. cynotis* in dogs in the Kars region and identifying the risk factors associated with otocariasis.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted on dogs brought to the Internal Medicine Clinic of the Kafkas University Animal Hospital. During this period, a total of 100 dogs from different breeds, genders, and age groups were included in the study.

The dogs examined in the clinic were first subjected to anamnesis, followed by clinical evaluations for symptoms such as restlessness, head shaking, itching in the ears, ear discharge, ear pain, ulceration, and erythema. Subsequently, otoscopic examinations were performed on the animals, and ear wax samples collected from the ear canal were subjected to microscopic examination at the Parasitology Department Laboratory of Kafkas University (4).

Statistical Analysis

The statistical analysis of all data was performed using the Chi-square test for independence to determine whether the differences between the groups were statistically significant. The analyses were conducted using R software (21). A significance level of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

In this study, the prevalence of *O. cynotis* infestation in dogs from the Kars region was 38% (38/100) determined. As seen in Table 1 and Table 2, the microscopic examination results revealed a positivity rate of 47.27% in female dogs and 26.67% in male dogs. Additionally, an infestation rate of 36.92% was observed in large breed dogs, while 40% was found in small breed dogs. The higher infestation rate in female dogs compared to male dogs may be attributed to hormonal differences and the effects of immune responses. However, it was determined that the breed factor had no statistically significant effect on the infestation rates ($P > 0.05$).

When the distribution of infestation rates by age groups was examined, a higher infestation rate of 46.67% was found in young dogs compared to older dogs. It was found that a large proportion of the infected dogs were strays and shelter dogs (54.29%). This situation suggests that the high animal population in shelter conditions and insufficient hygiene measures may increase the risk of infestation. Statistical analyses revealed that factors such as age and lifestyle have a significant impact on infestation rates ($P < 0.05$).

The obtained findings were statistically evaluated using the Chi-Square (χ^2) test, and risk factors influencing the disease development were analyzed. As a result of the analysis, a statistically significant relationship was found between age, lifestyle, and ownership status with *O. cynotis* infestation ($P < 0.05$).

Table 1. Distribution of *Otodectes cynotis* positive cases based on breed, gender, age, lifestyle, ownership status, season, and clinical condition.

No	Breed	Gender	Age	Lifestyle	Ownership status	Season	Clinical condition
1	KafkasX	♀	5 m	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
2	KafkasX	♂	10 m	Shelter	Stray	Autumn	Lesions around the right ear, Pruritus, Overall condition is good
3	KafkasX	♀	1.5	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
4	Kangal	♂	4 m	Shelter	Stray	Autumn	Alopecia in the head region, Ear discharge
5	Kangal	♀	2	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus, Erythema
6	Zagar	♀	7	Shelter	Stray	Spring	Diffuse alopecia
7	Zagar	♀	2 m	Shelter	Stray	Spring	Alopecia in the head region, Pruritus
8	Zagar	♂	3 m	Shelter	Stray	Spring	Focal alopecia on the dorsal region
9	Kangal	♀	6 m	Shelter	Stray	Autumn	Diffuse dandruff
10	Zagar	♀	2 m	Shelter	Stray	Spring	Partial dandruff and alopecia
11	KangalX	♂	3	Shelter	Stray	Autumn	Particularly in the ear and head regions, Dandruff and pruritus
12	Zagar	♀	3	Shelter	Stray	Spring	Ear discharge, Pruritus
13	Zagar	♀	2	Shelter	Stray	Spring	Alopecia and pruritus in the ear region
14	Zagar	♀	18 m	Shelter	Stray	Spring	Partial alopecia and pruritus in the ear region
15	Zagar	♀	2 m	Shelter	Stray	Spring	Alopecia in the dorsal and abdominal regions
16	KangalX	♀	18 m	Shelter	Stray	Autumn	Dandruff and pruritus in the head region
17	Zagar	♂	6 m	Shelter	Stray	Spring	Alopecia in the back and ear regions
18	Zagar	♀	4	Shelter	Stray	Spring	Ear discharge, Pruritus
19	Zagar	♂	6 m	Shelter	Stray	Spring	Diffuse alopecia
20	Zagar	♀	7 m	Shelter	Stray	Spring	Lesions around the eyes and ears, Ear discharge, Pruritus
21	Zagar	♂	2	Shelter	Stray	Spring	Alopecia in the back and ear regions
22	Zagar	♂	2	Shelter	Stray	Spring	Ear discharge, Pruritus
23	KafkasX	♀	1	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
24	KafkasX	♀	1	Shelter	Stray	Autumn	Poor general condition
25	KangalX	♂	6	Shelter	Stray	Autumn	Generalized alopecia, Poor overall condition
26	Kangal	♀	1.5	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
27	Kangal	♀	4	Shelter	Stray	Autumn	Alopecia in the head region, Pruritus
28	KafkasX	♀	1.5	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
29	KafkasX	♀	6	Shelter	Stray	Autumn	Alopecia in the head region
30	KafkasX	♀	2	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
31	KafkasX	♀	2	Shelter	Stray	Autumn	Alopecia in the head region
32	KafkasX	♀	2	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
33	KafkasX	♀	4	Shelter	Stray	Autumn	Diffuse alopecia
34	KafkasX	♀	3	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
35	KafkasX	♂	1	Shelter	Stray	Autumn	Itching
36	KafkasX	♂	2	Shelter	Stray	Autumn	Ear discharge, Pruritus
37	KafkasX	♀	4	Shelter	Stray	Autumn	Diffuse alopecia
38	KafkasX	♂	2	Shelter	Stray	Autumn	Alopecia in the head region

♀:female, ♂: male, m:month

Table 2. Risk factors associated with otocariasis in dogs

Risk Factors		n	Positive	Prevalence	χ ²	P
Breed	Large	65	24	36.92%	0.007	P>0.05
	Small	35	14	40%		
Gender	♀	55	26	47.27%	3.623	P>0.05
	♂	45	12	26.67%		
Age	Young	60	28	46.67%	3.907	P<0.05
	Adult	40	10	25%		
Lifestyle	Home	30	-	0%	24.014	P<0.05
	Shelter	70	38	54.29%		
Ownership status	Owned	30	-	0%	24.014	P<0.05
	Stray	70	38	54.29%		
Clinical condition	Healthy	24	13	54.16%	2.658	P>0.05
	Sick	76	25	32.89%		
Season	Autumn	55	24	43.64%	1.159	P>0.05
	Spring	45	14	31.11%		

n: number of dog

DISCUSSION AND CONCLUSION

The ear is a critical sensory organ in mammals responsible for hearing and balance functions, and its health maintenance is of paramount importance for animal welfare. Ear diseases can progress over time, leading to severe complications such as chronic otitis externa. Therefore, early diagnosis and appropriate treatment play a critical role in controlling infestations (22). In this study, the otodectic mange infestation caused by *O. cynotis* in dogs in the Kars region was investigated, and the prevalence rate was determined to be 38%. *Otodectes cynotis* is reported to be widely distributed worldwide and in Türkiye, and has been identified as the causative agent in more than 50% of otitis externa cases (4). The findings obtained not only reveal the prevalence of *O. cynotis* in dogs in the region but also support the necessity for early diagnosis of ear diseases and the application of appropriate antiparasitic treatments. Additionally, regional epidemiological studies to determine the spread dynamics of such infestations will contribute to the development of preventive veterinary practices.

Studies on *O. cynotis* infestation in dogs worldwide have reported varying prevalence rates across different regions. In this study, 38% of dogs in Kars province had *O. cynotis*, which is comparable to the 26% reported in Romania (23) and the 37.1% in Poland (24). In Türkiye, a study conducted on street dogs in Diyarbakır found that *Otodectes* spp. was identified as the causative agent in 28% of ear diseases (25). In a study conducted on street dogs in the Bursa region, the *O. cynotis* infestation was reported to be 3.44% (6), while a retrospective study conducted in Konya found an infestation rate of 1.23% (26). The variability in infestation rates reported in studies conducted in different regions of Türkiye may be related to regional ecological factors, climatic differences, the living conditions of the dogs, shelter hygiene, and differences in the diagnostic methods used in the studies (otoscopic examination only, skin scraping only). It is also thought that one of the most important reasons for the differences in prevalence rates depends on whether the animals included in the studies have received parasitic treatment before. While lower infestation rates are expected in animals that have received parasitic treatment, it is likely that higher infestation rates are detected in untreated animals. This situation, along with the methodological differences between studies, suggests that the treatment history of the populations evaluated could be a determining factor in the results. In this context, comprehensive epidemiological studies are needed to better understand the dynamics of *O. cynotis* infestation spread.

Otodectes cynotis infestation has been reported to be more prevalent in younger age groups of dogs (3,8,27). The findings obtained in this study also support the information presented in the literature. In our study, when dogs were classified according to age groups, the highest infestation rate was observed in young dogs (46.67%). The effect of age on infestation rates may be associated with immune system development, transmission risk, and behavioral differences. Since the immune systems of puppies and young dogs are not fully developed, they are known to be more susceptible to parasitic infestations. Moreover, young dogs are more likely to acquire the parasite through contact with their mothers or exposure to infected animals. Behaviorally, puppies

and young dogs are more curious and social compared to adults, leading to increased physical contact and, consequently, a higher risk of transmission. On the other hand, the decreased incidence of otoacariasis in older age groups may be associated with age-related acquired immune responses and the widespread use of macrocyclic lactones (e.g., avermectin and milbemycin group antiparasitic agents) (3). However, infestation cases have also been reported in immunosuppressed elderly dogs, with a prevalence of 25% determined in our study. Overall, the findings indicate that otodectic mange is most commonly observed in young dogs and that age may be a determining factor in infestation dynamics.

It has been stated that gender does not have an effect on otodectic mange infestation (3,28,29). However, in this study, infestation was found to be 47.27% in female dogs and 26.67% in male dogs ($P>0.05$). These findings suggest that gender could potentially be an influencing factor in the prevalence of otodectic mange. The higher infestation rates observed in female dogs may be associated with factors such as hormonal differences, immune responses, and lifestyle. It is suggested that hormonal changes occurring during the reproductive cycle may affect the immune system and increase susceptibility to parasites. However, more extensive and controlled studies are needed to definitively determine the effect of gender on infestation.

The living environments and lifestyles of dogs are considered significant risk factors in the spread of infestation (29). It has been reported that stray or shelter dogs play a critical role in the transmission and spread of the disease. The spread of ectoparasitic infestations is more commonly observed in young dogs or those with weakened immune status, particularly in communal living environments (4). In dogs kept in home environments, the risk of infestation is lower due to regular care, better nutritional conditions, and consistent ectoparasitic treatments. In contrast, such measures are often neglected in shelters or stray animal populations, leading to a higher prevalence of otodectic mange infestations. Indeed, in our study, the infestation rate in shelter dogs was found to be 54.29%, and as expected, otodectic mange was more prevalent in street or shelter dogs (3). These findings underscore the importance of managing stray animal populations, improving shelter conditions, and ensuring regular antiparasitic treatments to prevent and control *O. cynotis* infestations.

In this study, the susceptibility of dog breeds to *O. cynotis* infestation was investigated, with infestations found in 36.92% of large-breed dogs and 40% of small-breed dogs. However, the literature reports that dog breeds do not show a significant predisposition to ear mite infestations (8,30). The findings of our study suggest that infestation rates may vary according to breed, but breed alone is not a determining factor in the development of the disease. It is believed that environmental factors such as general care, hygiene conditions, and living environment play a more decisive role in the prevention of otodectic mange, rather than breed predisposition. Hygiene is a critical factor that prevents the proliferation of mites in dogs' ears. Regular ear cleaning reduces the parasite load, lowers the risk of infection, and prevents mite proliferation, thereby contributing to the control of infestation. In addition, maintaining hygienic conditions in the living environments of dogs, especially in shelters or multi-

animal settings, is an important strategy for preventing the spread of parasites. However, regular veterinary check-ups are of great importance for the early detection and effective treatment of otodectic mange. Specifically, identifying infested animals that do not exhibit clinical symptoms is a critical step in controlling the spread of the parasite. In this regard, the prevention and management of otodectic mange should be ensured through systematic care and health measures that should be applied to all dogs, regardless of breed.

In our study, the infestation rate of *O. cynotis* was found to be higher in autumn compared to spring. This finding can be explained by seasonal variations in temperature and humidity, which influence the reproduction rate and life cycle of mites (31). With the decrease in air temperatures during autumn, changes in the immune system of dogs may increase susceptibility to the parasite ($P<0.05$). Additionally, during the summer months, dogs spending more time in open areas have an increased likelihood of contact with infested animals, leading to a more pronounced manifestation of infestations in autumn. These findings are important for better understanding the seasonal distribution of otodectic mange and for implementing appropriate measures to control the infection.

As a result, in this study, the prevalence of ear mange in dogs in Kars province was investigated, and the presence of *O. cynotis*, one of the significant zoonotic agents in the region, has contributed to the literature. In Kars, alongside the intensive breeding of livestock such as cattle, sheep, and horses, the dog population is also found in high numbers. A large portion of these dogs are stray street dogs, while some are used as shepherd dogs or guard dogs. This study highlights the importance of *O. cynotis* in the region due to its zoonotic characteristics. As a result of the analysis, the relationship between age, lifestyle, and ownership status with *O. cynotis* infestation was found to be statistically significant ($P<0.05$), and these factors were identified as risk factors for the disease. Since *O. cynotis* is a pathogen that can easily be transmitted through direct contact, it is emphasized that necessary control and prevention programs should be implemented to prevent transmission both between animals and to humans. In addition to hygiene, it has been concluded that regular health check-ups are of great importance in the prevention and treatment of otodectic mange. Future studies, by supporting these findings with larger sample sizes, could contribute to the development of strategies for more effective management of ear diseases.

FINANCIAL SUPPORT

No funding was received from any organization for the conduct of this research.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) have declared that there is no potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The writing and final revisions of the study were carried out with contributions from all authors.

ETHICAL STATEMENT

The necessary permission for this study was obtained from the Kafkas University Local Ethics Committee for Animal Experiments with the decision number 2024-139, dated 04.07.2024.

REFERENCES

1. **Acar A, Yipel F (2016).** Factors related to the frequency of cat ear mites (*Otodectes cynotis*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 22: 75–78.
2. **Yang C, Huang HP (2016).** Evidence-based veterinary dermatology: a review of published studies of treatments for *Otodectes cynotis* (ear mite) infestation in cats. *Vet Dermatol.*, 27(4): 221–e56.
3. **Lefkaditis M, Spanoudis K, Panorias A, Sossidou A (2021).** Prevalence, intensity of infestation, and risk factors for *Otodectes cynotis* in young dogs. *Int J Acarol.*, 47(4): 281–283.
4. **Arslan MO, Sarı B (2023).** Medikal ve Veteriner Entomoloji. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara.
5. **Wall R, Shearer D (2001).** Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control. 2nd ed. Oxford (London): USA Blackwell Sciences, Iowa State University. p. 262.
6. **Saygın B, Girişgin AO, Zengin SA, Aydın L (2024).** Bursa yöresi sokak köpeklerinde uyuz enfestasyonlarının yaygınlığı. *Türkiye Parazit Derg.*, 48(1):45–50.
7. **Çakmak A, Vatanserver Z (1997).** Hayvanlarda Uyuz Hastalığı, Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir, s. 317–337
8. **Scott D, Miller W, Griffin C (2001).** Parasitic Skin Diseases. In Muller & Kirk's small animal dermatology. 6th ed. Philadelphia (Pennsylvania): W. B. Saunders Company. p. 476–484.
9. **Mullen GR, O'Connor BM (2019).** Mites (Acari). In: Mullen, G., Durden, L. (Eds.), Medical and Veterinary Entomology. Acad. Press, San Diego, p. 533–602.
10. **Diniz LSM, Costa EO, Oliveira PMA (1995).** Clinical disorders observed in anteaters (Myrmecophagidae, Edentata) in captivity. *Vet Res Commun.*, 19: 409–415.
11. **da Cruz CL, Alpino T, Kottwitz J (2017).** Recurrent ear mite (*Otodectes cynotis*) infestation in three related groups of Patagonian caviés (*Dolichotis patagonum*). *J Zoo Wildl Med.*, 48: 484–490.
12. **Wilhelm C, Kniha E, Muñoz P, Espinoza Á, Platner L, Dreyer S, Grund L, Lindhorst ZTL, Gartner U, Walochnick J, Taubert A, Fischer D, Hering-Hagenbeck S, Hermosilla C, Ebmer, D. (2025).** *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae) infestations in Southern pudus (*Pudu pudu*): In situ and ex situ data of an unexpected host-parasite record. *Int J Parasitol Parasites Wildl.*, 101043.
13. **Panarese R, Iatta R, Lia RP, Lebon W, Beugnet F, Otranto, D (2021).** Efficacy of afoxolaner for the treatment of ear mite infestation under field conditions. *Vet Parasitol.*, 300: 109607.
14. **Aydın L (2017).** Akar Enfestasyonları (UYUZ). Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir.
15. **Ural K, Voyvoda H, Ulutas B, Pasa S, Aysul N, Gultekin M (2012).** Understanding primary and secondary skin lesions among infectious dermatoses in dogs: lessons we learned from cases. *Anim Health Prod Hyg.*, 1: 86–99.
16. **Arslan MO, Umur S, Aydın L (1999).** The prevalence of Ixodidae species on cattle in Kars province of Turkey. *Türkiye Parazit Derg.*, 23: 331–5.
17. **Aydın N, Vatanserver Z, Arslan MO (2022).** Molecular Epidemiology of *Babesia* and *Theileria* Species in Sheep in Kars Region of Turkey. *Türkiye Parazit Derg.*, 46(1): 20–27.

18. Batı YU, Merhan O, Aydın N, Akyüz E, Sezer M, Erkiş EE, Vatansever Z, Kırmızıgül AH (2023). Serum neopterin and procalcitonin levels in dogs naturally infested with *Sarcoptes canis*. *Vet Sci Pract.*, 18(1): 31-34.
19. Taşçı GT, Aydın N, Ölmez N, Yiğit M, Işık ME, Vatansever Z (2023). Tick infestation in stray dogs: Kars, Ardahan, Iğdır. In, Proceedings of the "1st International Livestock Farming" Conference Dedicated to the 100th Anniversary of the Birth of the National Leader of Azerbaijan Heydar Aliyev and the Republic of Türkiye. 20-21 October, Lenkeran, Azerbaijan (Online).
20. Bozukluhan K, Gökçe Hİ (2009). Statistical evaluations of internal diseases in animals admitted to the clinics of the Faculty of Veterinary Medicine, The University of Kafkas, between 2000 and 2007. *Vet Hekim Der Derg.*, 80(1):45-52.
21. R Core Team (2024). *An introduction to R*. R Foundation for Statistical Computing. <https://cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/R-intro.pdf> Erişim Tarihi: 28.02.2025
22. Canpolat I, Tanrısever M, Başer S (2022). The prevalence of ear diseases in cat and dogs in Kocaeli provinces. *Turk J Vet Res.*, 6(2): 53- 60.
23. Mircean V, Mircean M, Gavrea R, Cozma V (2008). Epidemiological aspects of otitis externa in dogs. *Lucr Şt Med Vet.*, 41:427–436.
24. Święcicka N, Bernacka H, Fac E, Zawisław J (2015). Prevalence and commonest causes for otitis externa in dogs from two Polish veterinary clinics. *Bulgar J Vet Med.*, 18 (1):65–73.
25. Becerman V, Erol H, Hızlısoy H (2020). diyarbakır büyükşehir belediyesi hayvan bakım ve rehabilitasyon merkezindeki yaşayan köpeklerde görülen kulak hastalıklarının insidensinin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, 13: 39-43.
26. Ceylan C, İder M, Yalçın DS, Yılmaz S, Evcı A (2024). Prevalence of parasites detected in domestic dogs from Konya province: A retrospective study. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, 17(2):130-136.
27. Harwey RG, McKeever PJ (2006). Skin Diseases of the Dog and Cat. Çeviri: Oktay Deprem, Tahsin Yeşildere. Nobel Matbaacılık, İstanbul, 193- 200.
28. Rodriguez-Vivas R, Ortega-Pacheco A, Rosado-Aguilar J, Bolio G (2003). Factors affecting the prevalence of mange-mite infestations in stray dogs of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol.*, 115:61–65.
29. Souza CP, Ramadinha RR, Scott FB, Pereira MJS (2008). Factors associated with the prevalence of *Otodectes cynotis* in an ambulatory population of dogs. *Pesq Vet Bras.*, 28:375–378.
30. Çakmak F (2015). Köpeklerde kaşıntının etiolojisi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, (1): 1-8.
31. Bowman DD, Hendrix CM, Lindsay DS, Barr SC (2002). *Feline Clinical Parasitology*. 1st Ed. Iowa State University, A Blackwell Science Company, USA., p. 375-400.

Iron Metabolism and Haematological Changes in Ewes During The Periparturient Period

Ömer DENİZ^{1,a,✉}, Serkan BOZACI^{1,b}, Berrak Işık SOYTÜRK^{2,c}, Abdullah ŞİMŞEK^{3,d}, Tarık ŞAFAK^{2,e}, Kenan Çağrı TÜMER^{1,f}

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kastamonu University, Kastamonu, TÜRKİYE

²Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Kastamonu University, Kastamonu, TÜRKİYE

³İhsangazi Technical Science Vocational School, Kastamonu University, Kastamonu, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0002-2981-2032, ^b0000-0002-6239-1567, ^c0000-0001-62041674, ^d0000-0002-4077-3222, ^e0000-0002-6178-4641, ^f0000-0002-2861-0236

✉ Corresponding Author

Ömer DENİZ

Department of Internal Medicine,
Faculty of Veterinary Medicine,
Kastamonu University, Kastamonu,
TÜRKİYE

vetomerdeniz@gmail.com

Received
28.03.2025

Accepted
26.05.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1667415

How to cite: Deniz Ö, Bozacı S, Soy Türk BI, Şimşek A, Şafak T, Tümer KÇ (2025). Iron metabolism and haematological changes in ewes during the periparturient period. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):48-52.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

This study sought to evaluate changes in plasma iron (Fe), unsaturated iron-binding capacity (UIBC), and hematocrit (Hct) levels in pregnant ewes before and after parturition. Blood samples were collected 10 days before and 10 days after birth, and concentrations of Fe, UIBC, and Hct were evaluated. The results indicated a substantial reduction in plasma iron levels postpartum ($p=0.042$) and a considerable elevation in UIBC levels ($p=0.004$). No statistically significant variation in Hct level was observed between the prepartum and postpartum periods ($p=0.531$). The reduction in plasma iron levels may be linked to heightened physiological requirements for iron and bleeding associated with parturition. Increased UIBC levels indicate changes in transferrin binding capacity during the postpartum period. Hct levels remained consistent postnatally, signifying the preservation of hematopoietic equilibrium.

Key Words: Ewes, iron, unsaturated iron-binding capacity

Koyunlarda Periparturient Periyotta Demir Metabolizması ve Hematolojik Değişiklikler

Öz

Bu çalışma, gebe koyunlarda doğum öncesi ve sonrası plazma demir (Fe), doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ve hematokrit (Hct) seviyelerindeki değişimleri değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, doğumdan 10 gün önce ve doğumdan 10 gün sonra alınan kan örneklerinde Fe, UIBC ve Hct düzeyleri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, doğum sonrası dönemde plazma Fe seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığını ($p=0.0425$), buna karşılık UIBC seviyelerinin belirgin bir artış gösterdiğini ($p=0.0004$) ortaya koymuştur. Hematokrit seviyelerinde ise doğum öncesi ve sonrası dönemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.531$). Plazma Fe seviyelerindeki azalma, doğum sırasında meydana gelen kan kaybı ve artan fizyolojik demir ihtiyacı ile ilişkilendirilebilir. UIBC seviyelerindeki artış ise doğum sonrası transferrin bağlanma kapasitesindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Hct seviyelerindeki stabil durum, doğum sonrası hematopoetik dengenin korunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Demir, doymamış demir bağlama kapasitesi, koyun

INTRODUCTION

Iron (Fe) is an essential component of hemoglobin (Hb), as well as numerous enzymes and proteins, and it is continuously recycled within the erythrocyte cycle. Following the breakdown of aging erythrocytes, the released Fe can be stored in the form of ferritin or hemosiderin by the mononuclear phagocyte system or can bind to transferrin and be released into the plasma for use in the production of new erythrocytes (1,2). The capacity of transferrin to transport iron is defined as the total iron-binding capacity (TIBC) and is measured by the transferrin saturation. The unsaturated iron-binding capacity (UIBC) is calculated by subtracting the bound iron capacity from the total serum iron concentration (1). TIBC increases in cases of iron deficiency in humans, horses, cattle, and pigs, while it does not show significant changes in dogs. Additionally, it has been reported that TIBC is elevated in malnourished sheep, whereas it remains low or at the lower limit of the normal range in inflammatory diseases (2,3).

Iron deficiency leads to a reduction in hemoglobin (Hb) synthesis, resulting in increased erythrocyte division and the development of microcytosis (3,4). Typically, mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) are found at lower levels; however, in some cases, MCHC may remain within the normal range (2). Although microcytosis is primarily associated with iron deficiency but it can also be observed in other pathophysiological conditions (5). In anemias caused by chronic blood loss, iron depletion can lead to erythropoiesis suppression and normocytic anemia, whereas in inflammatory processes, iron retention results in decreased plasma iron levels (6,7). During pregnancy, anemia poses serious health risks, including fetal growth retardation (8).

In the evaluation of iron metabolism, parameters such as erythrocyte count (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin concentration (Hb), serum iron level (Fe), total iron-binding capacity (TIBC), unsaturated iron-binding capacity (UIBC), and transferrin saturation (TS%) are considered fundamental biochemical markers (6,9). Additionally, copper (Cu) deficiency can negatively impact erythropoiesis, leading to anemia (10). Although iron deficiency is relatively rare in ruminants, factors such as nutritional deficiencies, blood loss, or increased iron demand can contribute to its development (11). In anemia resulting from chronic blood loss, iron stores are initially depleted, and as the condition progresses, erythropoiesis is affected, leading to a decline in hemoglobin synthesis (12).

Total iron-binding capacity (TIBC), unsaturated iron-binding capacity (UIBC), and transferrin saturation percentage (%TS) are key parameters associated with iron deficiency and metabolic adaptations (13). However, long-term, controlled studies investigating iron metabolism and hematological changes in pregnant ewes during pre- and postpartum periods remain limited. In this study, the effects of pregnancy on iron metabolism were investigated by evaluating Fe, UIBC, and Hct levels in blood samples collected from ewes two weeks before and after parturition.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Housing Conditions

This study was conducted at the Ewes Husbandry Unit of Kastamonu University İhsangazi Vocational High School. Twelve clinically healthy Anatolian Merino ewes, confirmed to be negative for parasitic infections via flotation and sedimentation parasitological tests, were included in the study. The ewes were between 2 and 5 years of age, had optimal body condition, and were maintained under identical housing and feeding conditions. The study was carried out during the thermoneutral period of the year. The animals were grazed on pasture during the day, and upon being housed in the barn, their diet was supplemented according to the nutritional value of the pasture. Their ration was enriched with a commercial concentrate mixture containing alfalfa, wheat bran, sunflower meal, soybean meal, ground corn, barley, calcium carbonate, and a vitamin premix. All ewes had ad libitum access to drinking water.

Experimental Design and Blood Sampling

This study collected blood samples from the same ewes at two different time points: before and after parturition. The first blood samples were obtained 10 days (± 2 days) before the expected lambing date, while the second sampling was performed 10 days (± 2 days) postpartum. All blood samples were collected under sterile conditions via jugular venipuncture.

Biochemical Analyses

Blood samples collected in Vacusera 4 mL lithium heparin tubes (Türkiye) were centrifuged to separate the plasma, which was then stored at -20°C until analysis. Plasma iron (Fe) and unsaturated iron-binding capacity (UIBC) measurements were performed using the DiaSys respans[®] 910 Vet desktop biochemistry analyzer (DiaSys Diagnostic Systems, USA, Wixom, MI).

Hematological Analyses

Blood samples were drawn from the same vein and placed in 2 mL EDTA-coated vacutainer tubes (Hema&Tube[®], Türkiye) for hematological analysis. The samples were examined within two hours of being drawn. Hematocrit (Hct) was manually measured using the microhematocrit method. During blood sampling, special attention was given to minimizing the risk of contamination by shaving the phlebotomy site and disinfecting it with an antiseptic solution. The samples were transported to the laboratory in cold storage containers with ice and analyzed on the same day. This study did not include a control group but aimed to assess changes occurring in the prepartum and postpartum periods. No baseline values were established before blood collection.

Statistical Analysis

The statistical analyses of the obtained data were performed using MedCalc (Ostend, Belgium) statistical software. The normality assumption of the measured parameters was assessed using the Shapiro-Wilk test. Changes in plasma iron (Fe), UIBC concentration, and Hct level during the prepartum and postpartum periods were analyzed using the Wilcoxon

singed rank test. Graphs were generated using GraphPad software. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

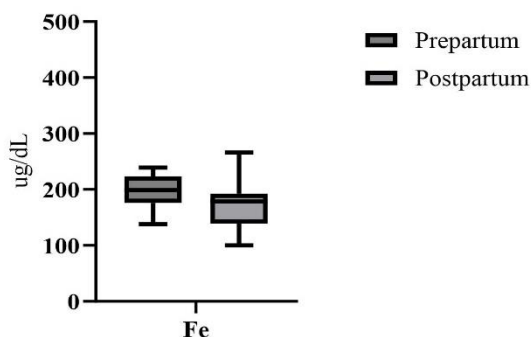
This study examined changes in plasma Fe, UIBC, and Hct parameters during the prepartum and postpartum periods. The findings were analyzed to assess the effects of parturition on iron metabolism and hematological adaptation processes in the postpartum period (Table 1).

Table 1. Prepartum ve postpartum dönemde plazma Fe, UIBC ve Hct değerleri. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (95% CI). Fe: Iron, UIBC: Unsaturated Iron Binding Capacity, Hct: Hematocrit.

Variable	Prepartum (n=12)	Postpartum (n=12)	Significance
Fe (ug/dL)	204 $\pm$ 27 (191-223)	171 $\pm$ 44 (139-192)	p=0.0425
UIBC (ug/dL)	215 $\pm$ 49 (185-246)	304 $\pm$ 58 (267-342)	p=0.0004
Hct (%)	37 $\pm$ 4 (34-39)	38 $\pm$ 2 (36-39)	p=0.5315

According to the obtained data, the Fe level was measured as 204 $\pm$ 27 μ g/dL in the prepartum period, whereas it decreased to 171 $\pm$ 44 μ g/dL in the postpartum period. This reduction in Fe levels was found to be statistically significant (p=0.042). The observed decline in the postpartum period may be associated with changes in maternal iron metabolism. The decrease in plasma iron levels can be explained by increased erythropoiesis, blood loss during parturition, and heightened iron demand in the postpartum period. The changes in plasma iron (Fe) levels during the prepartum and postpartum periods are presented graphically (Chart 1).

Chart 1. Box plot of prepartum and postpartum serum Fe concentrations in ewes. The horizontal line inside the box represents the median value, the box boundaries indicate the 25th and 75th percentiles, and the vertical lines (whiskers) show the minimum and maximum values. A statistically significant decrease in Fe levels was observed in the postpartum period (p = 0.042).



UIBC levels increased significantly from 215 $\pm$ 49 μ g/dL in the prepartum period to 304 $\pm$ 58 μ g/dL in the postpartum period (p=0.004). This significant rise in UIBC levels may reflect changes in transferrin binding capacity and reduced circulating free iron during the postpartum period. Additionally, the impact of postpartum inflammatory processes on iron metabolism could also contribute to the observed increase in UIBC levels. Chart 2 presents the changes in UIBC levels during the prepartum and postpartum periods.

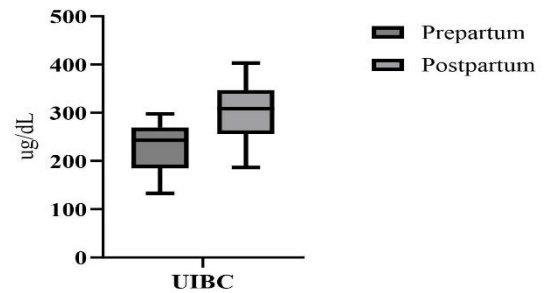
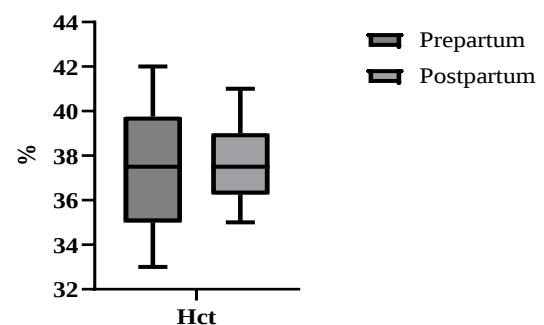


Chart 2. Box plot of serum UIBC levels measured in ewes during the prepartum and postpartum periods. The horizontal line inside the box represents the median value, the box boundaries indicate the 25th and 75th percentiles, and the vertical lines (whiskers) show the minimum and maximum values. A statistically significant increase in UIBC levels was observed in the postpartum period (p = 0.004).

Hct levels were measured at 37 $\pm$ 4% in the prepartum period and 38 $\pm$ 2% in the postpartum period. This change in Hct levels was not statistically significant (p=0.531). This result suggests that hematopoietic balance is maintained in the postpartum period and that the circulating erythrocyte mass remains largely preserved. Chart 3 illustrates the changes in Hct levels during the prepartum and postpartum periods.

Chart 3. Box plot of Hct levels measured in ewes during the prepartum and postpartum periods. The horizontal line inside the box represents the median value, the box boundaries indicate the 25th and 75th percentiles, and the vertical lines (whiskers) show the minimum and maximum values. No statistically significant difference was observed in Hct levels between the prepartum and postpartum periods (p = 0.531).



These findings indicate that plasma iron levels significantly decrease in the postpartum period, whereas UIBC levels show a statistically significant increase. On the other hand, the observed changes in hematocrit levels were not statistically significant, suggesting that parturition does not have a pronounced effect on hematocrit levels.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, changes in plasma Fe, UIBC, and Hct parameters were evaluated in pregnant ewes during the prepartum and postpartum periods. Our findings revealed a significant decrease in plasma iron levels in the postpartum period and a notable increase in UIBC levels. In contrast, no statistically significant change was observed in Hct levels.

The obtained results are significant in understanding the effects of parturition on iron metabolism and the changes in hematological parameters during the postpartum pe-

riod. In particular, the decline in plasma iron levels postpartum may be associated with the redistribution of maternal iron metabolism and increased physiological demands. The increase in UIBC levels could be linked to alterations in transferrin saturation and an elevated free iron-binding capacity during the postpartum period.

Significant changes in iron metabolism occur during the postpartum period. As shown in Figure 1, plasma iron levels postpartum exhibited a statistically significant decrease compared to the prepartum period ($p \leq 0.05$). This decline may be associated with physiological blood loss during parturition, increased erythropoiesis, and the heightened iron demand in the postpartum period. Additionally, the initiation of lactation and the subsequent utilization of iron for milk production could be another contributing factor to the reduction in plasma iron levels. These findings are consistent with previous studies (14-17) and support that iron homeostasis undergoes a postparturient reorganization, with maternal body resources adapting to changing physiological demands. Similarly, some studies have reported a decline in iron levels postpartum, suggesting that this reduction may be linked to postpartum inflammatory processes and iron metabolism regulation via hepcidin.

In the present study, the UIBC level was determined as 215 ± 49 µg/dL in ewes sampled 10 days before parturition and 304 ± 58 µg/dL in those sampled 10 days after parturition. In a study conducted on healthy Awassi sheep and sheep with iron deficiency anemia, UIBC levels were reported as 149 ± 5 µg/dL in non-pregnant ewes, 175 ± 7 µg/dL during the prepartum period, and 154 ± 9 µg/dL in the postpartum period (18). Similarly, in a study on Akkaraman sheep, the mean prepartum UIBC level was reported as 157.2 ± 5.3 µg/dL (6). A study conducted on cows also reported a prepartum UIBC level of 185.35 ± 9.78 µg/dL (19).

On the other hand, UIBC levels reported in a different study (3) were found to be higher than those obtained in the three previously mentioned studies. In our study, the UIBC levels were higher than those reported previously (6,18,19), but lower than those reported in another study (3). These variations suggest that prepartum and postpartum UIBC levels may vary across different sheep breeds and cattle, as reported in studies on different species. At the same time these discrepancies may be attributed to genetic variations among sheep, differences in analytical methods, dietary regimens, environmental factors, and iron metabolism changes associated with pregnancy. In particular, physiological alterations in iron-binding capacity during pregnancy and lactation may contribute to the differences observed across studies.

In this study, no statistically significant difference was found in hematocrit (Hct) levels between the prepartum and postpartum periods ($p = 0.531$). This finding suggests that hematopoietic balance is maintained postpartum and that erythropoiesis may have compensated for potential blood loss. Additionally, the stability of plasma volume could have contributed to the limited changes observed in hematocrit levels. In this study, the Hct level was found to be consistent with those reported in pregnant ewes in earlier studies (3,20). However, lower values were observed compared to those reported in previous studies (21,22). These variations among studies may be attributed to differences in breed, dietary regimens, and environmental conditions (23,24).

In this study, changes in plasma Fe, UIBC, and Hct levels were evaluated in pregnant ewes before and after parturition. The results indicated a significant decrease in plasma iron levels postpartum, whereas UIBC levels showed a notable increase. However, no significant difference was detected in Hct levels between the prepartum and postpartum periods. The decline in plasma iron levels may be associated with blood loss during parturition and an increased physiological demand for iron. The increase in UIBC levels could reflect changes in transferrin binding capacity in the postpartum period. Meanwhile, the stability of Hct levels suggests that hematopoietic balance was maintained. These findings contribute to a better understanding of the effects of parturition on hematological parameters and iron metabolism. Future studies may investigate these changes in different breeds and under varying environmental conditions to provide a more comprehensive analysis.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express gratitude to Kastamonu University for its support of the ewes breeding facility.

FINANCIAL SUPPORT

The author(s) assert that no financial assistance was obtained for the research, authorship, or publishing of this paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors assert that the research was performed without any commercial or financial affiliations that could be perceived as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

OD: Data curation, Writing – original draft, Methodology. SB: Writing–review & editing. BIS: Writing–original draft. AS: Writing–original draft. TS: Writing–review & editing. KCT: Formal analysis, Methodology, Resources, Writing–original draft.

ETHICAL STATEMENT

All procedures were conducted in accordance with the Animal Welfare Guidelines, and the study was approved by the Kastamonu University Animal Experiments Ethics Committee (21/2025).

REFERENCES

1. Missohou A, Nguyen TC, Dorchie P et al. (1998). Note on transferrin, hemoglobin types, and packed cell volume in Senegalese trypanotolerant Djallonké sheep. *Ann N Y Acad Sci*, 849:209–212.
2. Weiss DJ (2010). Iron and copper deficiencies and disorders of iron metabolism. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds). 6th ed., Blackwell, Iowa, USA, 167–171.
3. Cihan H, Temizel EM, Yilmaz Z et al. (2016). Serum iron status and its relation with haematological indexes before and after parturition in sheep. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 22(5).
4. Morin DE, Garry FB, Weiser MG et al. (1992). Hematologic features of iron deficiency anemia in llamas. *Vet Pathol.*, 29:400–404.

5. **Paltrinieri S, Preatoni M, Rossi S (2010).** Microcytosis does not predict serum iron concentrations in anaemic dogs. *Vet J.*, 185:341–343.
6. **Kozat S, Yüksek N, Göz Y et al. (2006).** Serum iron, total iron-binding capacity, unbound iron-binding capacity, transferrin saturation, serum copper, and hematological parameters in pregnant Akkaraman ewes infected with gastrointestinal parasites. *Turk J Vet Anim Sci.*, 30(6):601–604.
7. **Burns LM, Titchener RN, Holmes PH (1992).** Blood parameters and turnover data in calves infested with lice. *Res Vet Sci.*, 52:62–66.
8. **Breymann C (2002).** Iron deficiency and anaemia in pregnancy: modern aspects of diagnosis and therapy. *Blood Cells Mol Dis.*, 29:506–516.
9. **Grubač S, Cincović M, Radinović M et al. (2024).** Influence of frequent phlebotomy on blood iron concentration, haematological, metabolic and endocrine parameters in rams. *Acta Vet.*, 74(1).
10. **Barrionuevo M, Alferez MJM, Lopez Aliaga I et al. (2002).** Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci.*, 85:657–664.
11. **Suttle NF (2022).** Mineral Nutrition of Livestock. 5th ed., CABI Publishing, Wallingford, UK.
12. **Matzek LJ, LeMahieu AM, Madde NR et al. (2022).** A contemporary analysis of phlebotomy and iatrogenic anaemia development throughout hospitalization in critically ill adults. *Anesth Analg.*, 135(3):501–510.
13. **Szklarz M, Gontarz-Nowak K, Matuszewski W et al. (2022).** “Ferrocronology” – iron is an important factor involved in glucose and lipocronology. *Nutrients*, 14:4693.
14. **Alonso ML (2000).** Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *Sci Total Environ.*, 246:237–248.
15. **Azab ME, Abdel-Maksoud HA (1999).** Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. *Small Ruminant Res.*, 34(1):77–85.
16. **Yokus B, Cakir UD (2006).** Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biol Trace Elem Res.*, 109:255–266.
17. **Kılınc MA, Rişvanlı A, Şafak T et al. (2022).** The relationship of blood asprosin levels and biochemical parameters in pregnant cows. *Turk J Nat Sci.*, 11(4):111–116.
18. **AL-Hadty, H. A. H., AL-Badawi, N. M. (2012).** Evaluation of specific biochemical values in clinically normal and anemic Awassi sheep. *Int J Sci Nature.*, 3, 688-691.
19. **Şafak T, Yılmaz Ö, Rişvanlı A (2023).** Investigation of changes in biochemical parameters in some diseases occurring during the transition period in Simmental cows. *Isr J Vet Med.*, 78(1):18–23.
20. **Yenilmez K, Arslan S, Kılıç S et al. (2021).** The effect of twinning on selected hematological and biochemical parameters in late pregnant ewes. *Med Weter.*, 77(11):541–545.
21. **Khalif AT, Al-Thuwaini TM, Al-Shuhaib MBS (2020).** Association of litter size with hematology parameters of Awassi Iraqi ewes. *J Kerbala Agric Sci.*, 7(2):20–26.
22. **Habibu B, Kawu MU, Makun HJ et al. (2014).** Influence of sex, reproductive status and foetal number on erythrocyte osmotic fragility, haematological and physiologic parameters in goats during the hot-dry season. *Vet Med Czech.*, 59:479–490.
23. **Sharma A, Kumar P, Singh M et al. (2015).** Haemato-biochemical and endocrine profiling of north western Himalayan Gaddi sheep during various physiological/reproductive phases. *Open Vet J.*, 5:103–107.
24. **Soliman EB (2014).** Effect of physiological status on some hematological and biochemical parameters of Ossimi sheep. *Egypt J Sheep Goats Sci.*, 9:1–10.

Tekir Kedisinde Bulbus Oculi'nin Morfometrik Olarak İncelenmesi

Mustafa KORKMAZ^{1,a,✉}, Şevval ÖZDEMİR^{2,b}, Mehmet CAN^{1,c}

¹Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Balıkesir, TÜRKİYE

²Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0002-4493-0643, ^b0000-0002-0518-1272, ^c0000-0001-9409-026X

✉ Corresponding Author

Mustafa KORKMAZ

Balıkesir Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı,
Balıkesir, TÜRKİYE

mustafa.korkmaz@balikesir.edu.tr

Received
11.03.2025

Accepted
28.05.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1655606

How to cite: Korkmaz M, Özdemir Ş,
Can M (2025). Tekir kedisinde bulbus
oculi'nin morfometrik olarak incelen-
mesi. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*,
18(1):53-58.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Öz

Çalışmanın amacı Tekir kedilerinde bulbus oculi'nin morfometrik değerlerinin ortaya konmasıdır. Yapılan çalışmada travma, hastalık veya doğal yolla ölen 14 dişi ve 11 erkek toplam 25 adet yetişkin kediye ait 48 adet göz küresi kullanıldı. Diseksiyon yapılarak orbitadan ayrılan gözlerin hassas tartıyla ağırlık ölçümleri yapıldı. Bulbus oculi, cornea, lens ve pupilla üzerinde belirlenen 10 noktadan ölçümler gerçekleştirildi. Bulbus oculinin ağırlık ölçümlerinde erkek kedilerde sağ göz küresinin soldan daha ağır olduğu, dişilerde ise yine sağ göz küresinin daha ağır ancak erkeklere göre düşük ağırlıkta olduğu belirlendi. Erkek ve dişi kedilerde sağ göz küresi hacmi daha yüksek bulunurken bu değerlerin erkek kedilere oranla dişi kedilerde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bulbus oculi, lens, cornea ve pupilla'ya ait verilerin erkek Tekir kedilerde dişilere göre daha büyük değerlere sahip olduğu görüldü. Elde edilen verilerin göz ile ilgili hastalıklarda tanı ve tedavi metodlarında kullanılmasının yanı sıra bu konuda yapılacak anatomik ve klinik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bulbus oculi, cornea, okuler morfometri, tekir kedis

Morphometric Investigation of Bulbus Oculi in Tabby Cat

Abstract

The aim of the study is to determine the morphometric values of the bulbus oculi in Tabby cats. In this research, 48 eyeballs from a total of 25 adult cats, including 14 females and 11 males, that died naturally or due to trauma or disease were used. The eyeballs were dissected and separated from the orbit, and their weights were measured using a precision scale. Measurements were taken from 10 specific points on the bulbus oculi, cornea, lens, and pupil. In the weight measurements of the bulbus oculi, it was determined that the right eyeball was heavier than the left in male cats, whereas in females, the right eyeball was also heavier but with a lower weight compared to males. In both male and female cats, the volume of the right eyeball was found to be greater; however, this value was determined to be lower in females compared to males. As a result, the values of the bulbus oculi, lens, cornea, and pupil were found to be higher in male Tabby cats than in females. The obtained data are expected to contribute to anatomical and clinical studies in this field, as well as to the diagnosis and treatment methods of ocular diseases.

Key Words: Bulbus oculi, cornea, ocular morphometry, tabby cat

GİRİŞ

Evcil kedi, Avrupa (*Felis silvestris silvestris*) ve Afrika (*Felis silvestris lybica*) yabani kedisinden türemiştir (1). Kedi türlerinden en yaygınlarından biri olan tekir kedisinin isimlendirilmesindeki tekir ifadesi, kedilerin postlarındaki çizgileri belirtmek için kullanılmıştır. Ayrıca “tekir” kelimesi, Latince de kaplan anlamına gelen “tigris” sözcüğünden köken almaktadır. Tekir kediler, zekâsı, oyunculuğu ve sevimliliğiyle dikkat çeker. Vücut oranlarına göre evcil memeli hayvanlar içinde en büyük bulbus oculi'ye sahip canlı kedilerdir (2).

Carnivorlarda bulbus oculi 20-24 mm çapındadır (3). Bulbus oculi'nin anatomik konumu hayvanların av ya da avcı olmalarına ilişkin bilgi vermektedir. Kediler, carnivor grubunda bulunur ve avcı türler olarak tanımlanabilen bu türde gözler, rostralateralde bulunurken av olarak tanımlanabilen geviş getiren hayvanların gözleri lateralde bulunur (4). Kedilerin gözleri rostral'de bulunmakla beraber görüş alanı çakıştığı için binoküler görüşe de sahiptir (5). Bunun yanı sıra kedilerin gözleri, geniş cornea, derin ön kamera, geriye yerleşik lens, rod ağırlıklı retina ve tapetum lucidum varlığıyla gece görüşüne iyi adaptedir (6). Diğer hayvanlar arasında daha dar bir görüş alanı ile hassas derinlik algısı ve yakındaki nesnelere odaklanma yeteneğiyle ön plana çıkar (7).

Bulbus oculi, orbita olarak adlandırılan anatomik yapının içinde bulunmaktadır (8). Cornea'nın öne doğru taşıdığı kısma oranla daha eğimli olan arka bölüme sahip olduğundan göz küresinin dış kenarı tamamen yuvarlak değildir (3). Bulbus oculi, dıştan içe doğru; tunica fibrosa bulbi, tunica vasculosa bulbi, tunica interna bulbi olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır. Tunica fibrosa bulbi'de cornea ve sclera, tunica vasculosa bulbi'de iris, corpus ciliare ve choroidea, tunica interna bulbi'de ise retina bulunur (4,9,10). Bu üç tabaka tarafından sınırlanan göz küresinin içinde corpus vitreum, lens ve humor aquoeus da bulunur (11).

Tekir kedilerinde bulbus oculi'nin anatomik ve morfometrik yapısının belirlenmesi, klinisyenlere operatif yaklaşımlarında ve literatüre katkı sunması amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Ülkemizde evlerde bakılan ve sokak kedilerinin büyük çoğunluğu Tekir kedilerden oluşmaktadır. Hayatımızda bu kadar iç içe olan bir kedi ırkı olan Tekir kedisinin bulbus oculi'nin yapısal özelliklerinin bilinmesi elzemdir. Sunulan çalışmada doğal yolla, trafik kazasında veya bir hastalık sonucu ölmüş olan Tekir kediler kullanıldı. Çalışmada, yaşları 4-11 ve 2.5-5.8 kilogram arsında değişen 14 dişi ve 11 erkek toplam 25 kediye ait 48 bulbus oculi kullanıldı. Materyaller arasında 2 göz hasarlı olduğundan hesaplamalara dahil edilmemiştir. Bu materyallerin deforme veya nekroze olmadığına dikkat edildi.

Materyaller, Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Laboratuvarı'na getirilerek %10 formaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Bu işlem sonrasında bulbus oculi'ye zarar vermeden ekstirpasyon işlemi gerçekleştirildi. Çevre dokular uzaklaştırıldıktan sonra materyallerin ağırlıklarını tespit etmek için hassas tartı (ZENCRO P221, Ölçüm hassasiyeti: 0.1 gram) ile tartıldı. Bulbus oculi ve cornea'ya ait ölçümler gerçekleştirildi. Bulbus oculi'ye enine ensizyon yapılarak lens ve pupilla çıkarılmasının ardından morfometrik ölçümler yapıldı. Verilerin ortalama ve standart hata değerleri Microsoft Excel uygulaması ile elde edildi.

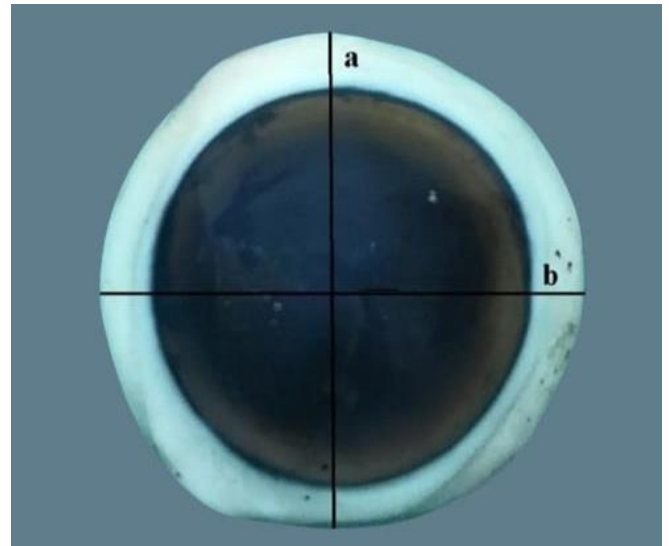
Morfometrik inceleme amacıyla Bulbus oculi'de 3, corneada 2, pupillada 2, lensde 3 tane olmak üzere toplam 10 ölçüm noktası saptandı. Bu ölçüm noktaları Demircioğlu ve Yılmaz'ın (2) yapmış olduğu çalışmaya göre belirlendi. Bu ölçümleri elde etmek amacıyla Piranha (PDC 1850, Ölçüm hassasiyeti: 1/10) marka dijital kumpas kullanıldı. Anatomik terimlerin isimlendirilmesi için Nomina Anatomica Veterinaria'dan (NAV) (12) yararlanıldı.

Bulbus Oculi'ye Ait Ölçüm Noktaları

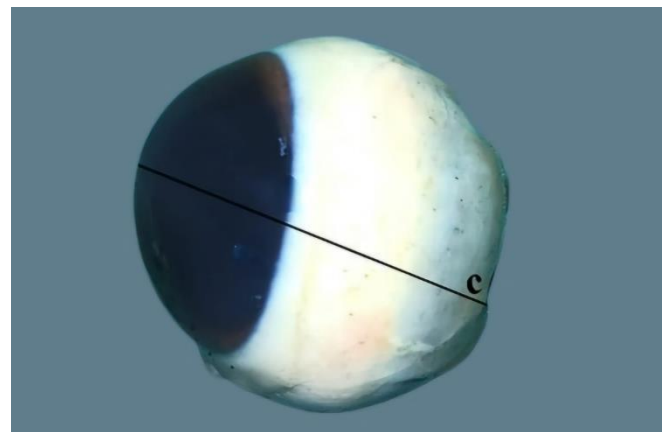
a. Dorso-ventral (DV) çap: Bulbus oculi'nin dorsalindeki en uç nokta ile ventralindeki en uç nokta arası mesafe (Şekil 1-a).

b. Medio-lateral (ML) çap: Bulbus oculi'nin temporal ve nasal bölümündeki uç noktalar arası mesafe (Şekil 1-b).

c. Axial uzunluk/çap: Polus anterior ile polus posterior arası mesafe (Şekil 2-c).



Şekil 1. Bulbus oculi'nin ölçüm noktaları (a: DV çap, b: ML çap)

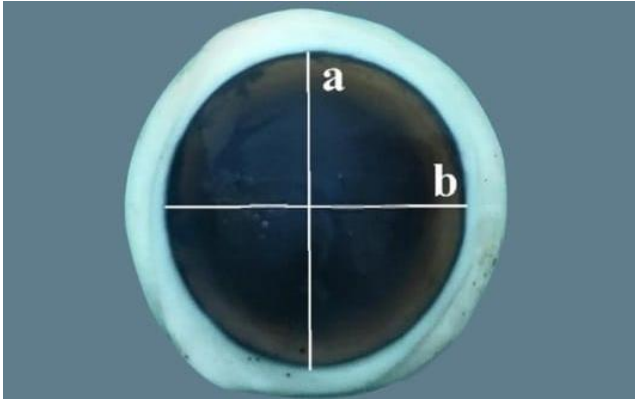


Şekil 2. Bulbus oculi'nin ölçüm noktaları (c: axial çap)

Cornea'ya Ait Ölçüm Noktaları

a. Dorso-ventral (DV) çap: Cornea'nın dorsalindeki en uç nokta ile ventralindeki en uç nokta arası mesafe (Şekil 3-a).

b. Medio-lateral (ML) çap: Cornea'nın temporal ve nasal bölümündeki uç noktalar arası mesafe (Şekil 3-b).

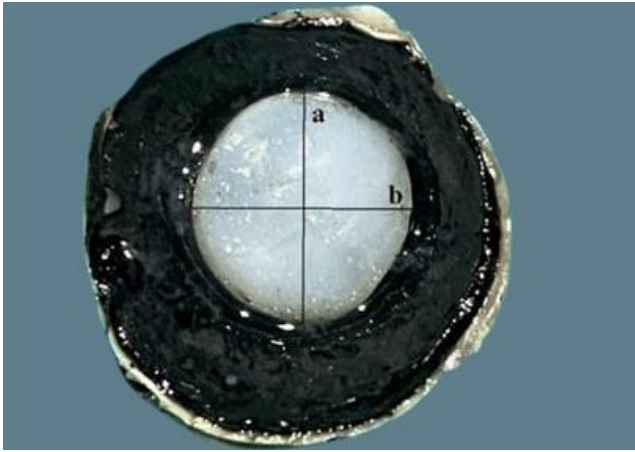


Şekil 3. Cornea'ya ait ölçüm noktaları (a: DV çap, b: ML çap)

Pupilla'ya Ait Ölçüm Noktaları

a. Dorso-ventral (DV) çap: Pupilla'nın dorsalindeki en uç nokta ile ventralindeki en uç nokta arası mesafe (Şekil 4-a).

b. Medio-lateral (ML) çap: Pupilla'nın temporal ve nasal bölümündeki uç noktalar arası mesafe (Şekil 4-b).



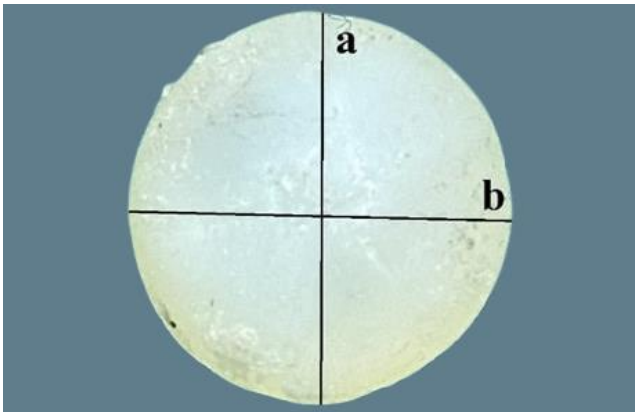
Şekil 4. Pupilla'ya ait ölçüm noktaları (a: DV çap, b: ML çap)

Lens'e Ait Ölçüm Noktaları

a. Dorso-ventral (DV) çap: Lensin dorsalindeki en uç nokta ile ventralindeki uç nokta arası mesafe (Şekil 5-a).

b. Medio-lateral (ML) çap: Lensin temporal ve nasal bölümündeki uç noktalar arası mesafe (Şekil 5-b).

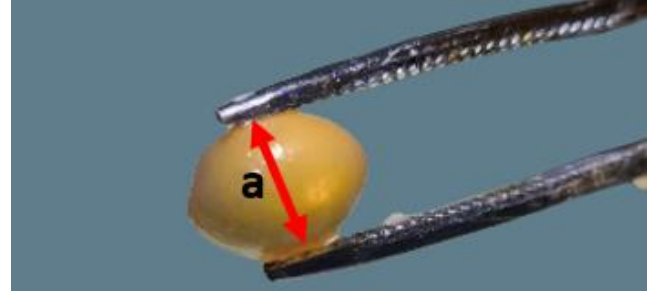
c. Kalınlık: Lensin orta noktasından anterior ve posterior uç noktalar arası mesafe (Şekil 6)



Şekil 5. Lense ait ölçüm noktaları. (a: DV çap, b: ML çap.)

Göz küresine ait hesaplamalar için üç çaplı formülden yararlanılmıştır (13). Bu formül;

$(GKH^3 - \text{Göz Küresinin Hacmi}); [(Göz küresinin maksimum aksiyal uzunluğu / 2) \times (Göz küresinin maksimum mediolateral uzunluğu / 2) \times (Göz küresinin maksimum yüksekliği / 2) \times (4/3) \times \pi] / 1000$



Şekil 6. Lense ait ölçüm noktaları. (a: Lens kalınlığı)

BULGULAR

Genel morfometrik inceleme sonucunda tüm bulbus oculi şekillerinin küreye benzer olduğu görüldü. Yapılan enine en-sizyon ile saydam jel kıvamında humor vitreus sıvısı gözlemlendi. Bu sıvı boşaltılarak lens çıkarıldı ve bulbus oculi'nin posterior bölümündeapedum lucidum'un varlığı tespit edildi. Aapedum lucidum, kedilerin tamamında sarı renkte gözlemlendi.

Erkek ve dişi kedilerde belirlenen değerler Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Erkek Tekir kedilerin sağ bulbus oculi ağırlığı 4.94 ± 0.09 gram; dişi Tekir kedilerde ise aynı değer 3.56 ± 0.22 gram olarak hesaplandı. Sol bulbus oculi ağırlıkları ise erkek Tekir kedilerde 4.36 ± 0.18 gram; dişi kedilerde ise 3.58 ± 0.23 gram olarak bulundu.

Cinsiyet ayrımı yapmaksızın incelenen 48 bulbus oculi'nin medio-lateral çap ortalamasının dorso-ventral çap ortalamasından daha fazla olduğu sonucuna ulaşıldı. Kıyaslamalara cinsiyetlerin dahil edilmesiyle dorso-ventral çap ortalamaları erkek Tekir kedilerde 19.35 mm; dişilerde ise 17.63 mm bulunurken medio-lateral çap ortalamaları erkek Tekir kedilerde 20.32 mm ve dişi Tekir kedilerde 18.24 mm olarak bulundu. Bulbus oculi'nin axial çapın uzunluğu ortalaması erkek kedilerde 20.58 mm (Tablo 1) ve dişi kedilerde ise 18.87 mm olarak ölçüldü (Tablo 2). Erkek kedilere ait parametrelerin dişilere oranla daha yüksek olduğu görüldü.

Cornea'nın dorso-ventral çap ortalaması erkek Tekir kedilerde 14.29 mm ve dişi kedilerde 13.31 mm olarak saptandı. Medio-lateral çap ortalaması erkek Tekir kedilerde 15.23 mm iken dişi Tekir kedilerde 14.21 mm olarak bulundu. Cornea ölçüm sonuçlarında erkek Tekir kedisinin değerlerinin daha büyük olduğu görüldü.

Pupilla'ya ait incelemelerde erkek kedilerde dorso-ventral çap ortalaması 9.45 mm, dişilerde 8.85 mm olarak hesaplandı. Pupilla'nın medio-lateral çap ortalaması erkek Tekir kedilerde 10.31 mm ve dişilerde 9.19 mm olarak bulundu.

Erkek kedilerde lensin dorso-ventral çap ortalaması 9.84 mm ve dişilerde 9.51 mm olarak hesaplandı. Lens'in medio-lateral çap ortalaması erkek Tekir kedilerde 10.32 mm ve dişilerde 9.70 mm olarak bulundu. Lens kalınlığı ise ortalama erkek kedilerde 7.11 mm ve dişilerde 6.79 mm olarak ölçüldü.

Elde edilen veriler kullanılarak göz küresi hacmi hesaplandı. Bu değer, erkek hayvanlarda sırasıyla sağ ve sol göz küresinin hacmi; $4.76 \pm 0.27 \text{ mm}^3$ ve $3.84 \pm 0.25 \text{ mm}^3$, dişi hayvanlarda ise bu değer sırasıyla sağ ve sol göz küresi için; $3.3 \pm 0.28 \text{ mm}^3$ ve $3.28 \pm 0.32 \text{ mm}^3$ olarak bulundu. Son olarak erkek ve dişi kedilerde sağ göz küresi değerlerinin daha büyük olduğu, her iki cinsiyet karşılaştırıldığında ise erkeklerde ölçüm değerlerinin daha büyük olduğu görüldü.

Tablo 1. Erkek Tekir kedilerine ait Bulbus oculi'nin morfometrik analizi

Ölçüm Noktası		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Orta-lama	Std. Hata	Std. Sapma
Bulbus oculi ağırlığı (gr)	Sağ	5.15	5.09	5.50	4.86	4.35	4.97	5.25	4.82	4.70	5.15	4.58	4.94	0.09	0.32
	Sol	4.60	4.15	3.64	4.02	5.54	3.50	-	4.36	4.53	4.85	4.41	4.36	0.18	0.59
Bulbus Oculi'nin DV çapı (mm)	Sağ	20.10	21.00	21.00	22.00	20.00	18.00	20.00	19.60	19.40	19.70	18.20	19.90	0.35	1.17
	Sol	19.00	21.00	15.00	18.00	18.00	20.00	-	18.80	20.00	19.30	19.00	18.81	0.51	1.62
Bulbus Oculi'nin ML çapı (mm)	Sağ	22.00	22.00	23.00	24.00	21.00	19.00	21.00	20.30	20.00	20.40	19.00	21.06	0.47	1.57
	Sol	20.00	21.00	16.00	19.00	19.00	20.00	-	19.90	21.00	20.00	20.00	19.59	0.45	1.42
Bulbus Oculi axial çapı (mm)	Sağ	23.40	24.00	23.00	22.00	22.00	20.00	21.00	21.20	20.30	19.80	19.80	21.50	0.45	1.49
	Sol	22.00	21.00	16.00	18.00	20.00	22.00	-	19.00	19.80	19.60	19.30	19.67	0.57	1.81
Cornea'nın DV çapı (mm)	Sağ	14.00	10.00	12.00	13.00	15.00	14.00	15.00	15.40	15.00	15.90	14.90	14.01	0.52	1.74
	Sol	16.00	14.00	13.00	13.00	14.00	15.00	-	15.20	14.80	15.50	15.20	14.57	0.32	1.02
Cornea'nın ML çapı (mm)	Sağ	16.00	12.00	14.00	14.00	16.00	15.00	15.00	15.80	16.00	16.90	15.50	15.10	0.40	1.35
	Sol	16.00	16.00	13.00	14.00	15.00	16.00	-	15.60	15.60	16.50	16.00	15.37	0.34	1.08
Pupilla'nın DV çapı (mm)	Sağ	10.00	11.00	9.00	7.00	8.00	7.00	9.00	12.00	11.10	11.20	12.60	9.80	0.58	1.94
	Sol	8.00	9.00	8.00	8.00	7.00	6.00	-	11.00	11.10	11.80	11.20	9.11	0.64	2.02
Pupilla'nın ML çapı (mm)	Sağ	11.00	12.00	10.00	9.00	8.00	8.00	10.00	13.10	12.20	12.20	13.00	10.77	0.56	1.89
	Sol	9.00	9.00	8.00	8.00	8.00	7.00	-	12.10	11.90	13.20	12.30	9.85	0.71	2.26
Lens'in DV çapı (mm)	Sağ	9.00	10.00	10.00	10.00	8.00	7.00	9.00	11.10	10.70	11.70	10.90	9.76	0.42	1.40
	Sol	11.00	8.00	9.00	9.00	9.00	10.00	-	10.80	10.60	11.00	10.80	9.92	0.34	1.08
Lens'in ML çapı (mm)	Sağ	11.00	11.00	10.00	11.00	9.00	9.00	10.00	10.90	10.30	11.20	10.50	10.35	0.23	0.78
	Sol	11.00	9.00	10.00	10.00	10.00	11.00	-	10.30	10.40	10.80	10.40	10.29	0.18	0.59
Lens Kalınlığı(mm)	Sağ	8.00	8.00	7.00	7.00	6.00	6.00	7.00	7.91	7.30	7.40	7.80	7.21	0.21	0.72
	Sol	8.00	6.00	6.00	6.00	7.00	7.00	-	7.60	7.30	7.30	7.90	7.01	0.24	0.77
Bulbus Oculi'nin Hacmi (mm ³)	Sağ	5.41	5.80	5.81	6.07	4.83	3.57	4.61	4.45	4.12	4.16	3.58	4.76	0.27	0.89
	Sol	4.37	4.84	2.00	3.22	3.57	4.60	-	3.71	4.35	3.95	3.83	3.84	0.25	0.81

Tablo 2. Dişi Tekir kedilerine ait Bulbus oculi'nin morfometrik analizi

Ölçüm Noktası		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Orta-lama	Std. Hata	Std. Sapma
Bulbus oculi ağırlığı (gr)	Sağ	2.93	2.70	3.92	4.76	2.60	2.92	2.50	4.86	3.80	-	3.76	3.26	3.80	4.58	3.56	0.22	0.82
	Sol	5.08	2.59	3.05	4.68	2.80	4.80	2.64	2.60	3.76	3.13	4.05	3.33	3.30	4.36	3.58	0.23	0.87
Bulbus Oculi'nin DV çapı (mm)	Sağ	19.00	16.00	19.00	20.00	16.00	15.00	18.00	21.00	15.00	-	17.40	17.70	19.30	18.20	17.81	0.52	1.89
	Sol	20.00	10.00	16.00	20.00	20.00	20.00	16.00	18.00	16.00	15.00	18.40	16.80	18.20	19.90	17.45	0.74	2.80
Bulbus Oculi'nin ML çapı (mm)	Sağ	20.00	17.00	20.00	21.00	17.00	17.00	18.00	22.00	15.00	-	18.10	14.30	20.40	19.10	18.37	0.63	2.31
	Sol	20.00	11.00	18.00	21.00	21.00	21.00	17.00	18.00	17.00	16.00	19.20	14.60	19.10	20.70	18.11	0.76	2.87
Bulbus Oculi axial çapı (mm)	Sağ	18.00	18.00	22.00	20.00	16.00	17.00	18.00	21.00	16.00	-	19.80	17.40	21.00	19.90	18.77	0.54	1.97
	Sol	23.00	15.00	19.00	20.00	19.00	24.00	17.00	16.00	17.00	17.00	19.80	19.10	19.60	20.10	18.97	0.66	2.50
Cornea'nın DV çapı (mm)	Sağ	13.00	12.00	15.00	15.00	10.00	12.00	13.00	13.00	11.00	-	13.60	13.10	13.70	14.60	13.00	0.41	1.48
	Sol	14.00	11.00	13.00	15.00	15.00	13.00	14.00	12.00	14.00	13.00	13.60	14.00	13.90	15.30	13.62	0.31	1.17
Cornea'nın ML çapı (mm)	Sağ	14.00	14.00	15.00	15.00	11.00	14.00	14.00	13.00	12.00	-	14.70	14.30	14.60	15.10	13.90	0.33	1.23
	Sol	15.00	12.00	15.00	15.00	16.00	15.00	15.00	13.00	15.00	13.00	14.40	14.60	14.70	15.70	14.52	0.29	1.11
Pupilla'nın DV çapı (mm)	Sağ	9.00	7.00	7.00	8.00	8.00	9.00	7.00	8.00	7.00	-	11.90	11.80	11.50	10.40	8.89	0.52	1.90
	Sol	8.00	7.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	7.00	11.60	11.40	11.30	11.20	8.82	0.45	1.71
Pupilla'nın ML çapı (mm)	Sağ	9.00	8.00	8.00	8.00	8.00	9.00	8.00	8.00	8.00	-	10.90	10.90	11.20	11.60	9.12	0.40	1.46
	Sol	9.00	7.00	9.00	9.00	9.00	8.00	9.00	8.00	9.00	8.00	10.60	10.40	11.90	11.80	9.26	0.38	1.44
Lens'in DV çapı (mm)	Sağ	9.00	9.00	8.00	9.00	8.00	9.00	9.00	9.00	9.00	-	10.70	10.60	10.50	10.70	9.34	0.26	0.96
	Sol	9.00	8.00	10.00	10.00	10.00	10.00	9.00	9.00	9.00	8.00	11.10	11.00	11.00	10.60	9.69	0.27	1.05
Lens'in ML çapı (mm)	Sağ	10.00	9.00	8.00	9.00	8.00	10.00	9.00	10.00	9.00	-	10.40	10.30	10.20	10.50	9.49	0.24	0.88
	Sol	10.00	9.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	9.00	9.00	10.60	10.50	10.60	10.20	9.92	0.14	0.55
Lens Kalınlığı(mm)	Sağ	7.00	7.00	7.00	6.00	6.00	6.00	7.00	7.00	6.00	-	7.90	7.90	7.90	7.40	6.93	0.20	0.74
	Sol	7.00	5.00	6.00	7.00	7.00	6.00	7.00	7.00	6.00	5.00	7.40	7.60	7.40	7.90	6.66	0.24	0.92
Bulbus Oculi'nin Hacmi (mm ³)	Sağ	3.57	2.56	4.39	4.39	2.35	2.26	3.05	5.07	1.88	-	3.26	2.30	4.32	3.62	3.30	0.28	1.01
	Sol	4.81	0.86	2.86	4.39	4.17	5.27	2.41	2.71	2.41	2.13	3.66	2.45	3.56	4.33	3.28	0.32	1.23

TARTIŞMA VE SONUÇ

Avcı türler olarak tanımlanan carnivorlarda olduğu gibi Tekir kedilerinde de gözler rostralateralde yer almaktaydı. Literatür bildirimleriyle (4,5,10) uyumlu olarak bulbus oculi küre şekildeydi veapedum lucidum sarıydı.

Erkek Tekir kedilerinde bulbus oculi'nin ağırlığı ortalama±standart sapma 4.65±0.54 gram ve dişi kedilerde ise bu

değer 3.57±0.83 gram olduğu tespit edildi. Bu bulgular sonucunda bulbus oculi ağırlığının erkek kedilerde daha fazla olduğu saptandı. Sağ bulbus oculi'nin medio-lateral ve dorso-ventral çapları sol bulbus oculinin aynı ölçümlerden daha fazla olduğu tespit edildi. Bulbus oculi'nin genel şekli dorsal-den basık olduğundan dolayı medio-lateral çap uzunlukları

daha fazlaydı. Tekir kedilerinde lens kalınlıklarının her iki cinsiyette de birbirine yakın değerlere sahip olduğu ortaya kondu.

Bulbus oculi'ye ait ölçüm parametrelerinden biri olan axial çap erkek hayvanlarda ortalama±standart sapma 20.62 ± 1.86 mm ve dişi hayvanlarda ortalama±standart sapma 18.87 ± 2.28 mm idi. Bu çap Van kedilerinde yapılan çalışma sonucunda 21.70 ± 0.10 mm (14) olarak bildirilirken, Ersoy'un (13) çalışmasında ultrasonografik görüntülerden yaptığı ölçümler sonucu erkek hayvanlarda 19.84 mm ve dişi hayvanlarda ise 19.86 mm olduğunu belirlemesine karşın aynı değer BT görüntülerinde erkek hayvanlarda 20.27 mm ve dişi hayvanlarda 20.11 mm olduğu bildirilmiştir. Elde edilen verilere göre Tekir kedilerinde bulbus oculi'nin axial çap uzunluğu Van kedisi (14) ve Ersoy'un (13) yapmış olduğu çalışmadaki verilerinden daha küçüktür. Aynı çalışmadaki BT değerlerinden ise daha büyüktür. Yılmaz (7) yaptığı tez çalışmasında bulbus oculinin axial uzunluğunu; Alman çoban köpeklerinde 21.28 mm, Kangal ırkında 24.52 mm, Golden ırkında 22.32 mm, Rotweiller ırkında 23.95 mm, Husky ırkında 21.76 mm, Dogo ırkında 20.95 mm, Pug ırkında 16.64 mm, Pomerian ırkında 13.84 mm ve M. Pincher ırkı köpekte 14.91 mm olduğu belirtilmiştir. Tekir kedilerinin köpeklerden ise; Pug, Pomerian ve Pincher ırklarından daha büyük çapa sahip olduğu görüldü (7).

Bulbus oculi'nin dorso-ventral çapı sağ göz için erkek hayvanlarda 19.90 ± 1.17 mm ve dişilerde 17.81 ± 1.88 mm iken sol göz için erkek hayvanlarda 18.81 ± 1.62 mm ve dişilerde 17.45 ± 2.80 mm olarak bulundu. Van kedilerinde yapılan çalışmada (14) sağ göz için erkek hayvanlarda 2.07 ± 0.06 cm ve dişilerde 2.07 ± 0.11 cm iken sol göz için erkek hayvanlarda 2.09 ± 0.03 cm ve dişilerde 2.05 ± 0.09 cm olduğu bildirilmiştir. Ersoy (13) yapmış olduğu çalışmada bu değer US görüntüleri aracılığıyla sağ göz için erkek hayvanlarda 19.71 mm ve dişilerde 19.24 mm olarak; sol göz için erkek hayvanlarda 19.42 mm ve dişilerde 19.67 mm iken BT görüntülerinden aynı değer sağ göz için erkeklerde 20.06 mm ve dişilerde 19.99 mm iken sol göz için erkek hayvanlarda 20.28 mm ve dişilerde 19.83 mm olduğu bildirilmiştir. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın evcil kedilerde (15) sağ göz için 2.02 ± 0.05 cm ve sol göz için 2.02 ± 0.05 cm olduğu saptanmıştır. Erkek kedilerde sağ göz Ersoy'un (13) USG verileri hariç diğer değerlerden ve sol göz literatür verilerinden daha düşüktür. Dişi hayvanlarda ise bu parametre Tekir kedilerde hem sağ hem de sol göz için daha düşük değere sahiptir. Van kedilerinde sağ ve sol bulbus oculi dorso-ventral çapı farklılığı, sunulan çalışmadan daha büyüktür.

Bulbus oculi'nin medio-lateral çapı Tekir kedilerde sağ göz için erkek hayvanlarda 21.06 ± 1.57 mm ve dişilerde 18.37 ± 2.30 mm iken sol göz için erkek hayvanlarda 19.59 ± 1.42 mm ve dişilerde 18.11 ± 2.87 mm olduğu görüldü. Aynı değer cinsiyet ayrımı yapılmaksızın evcil kedilerde (15) yapılan çalışmada sağ göz için 2.00 ± 0.08 cm ve sol göz için 19.8 ± 0.07 mm olarak bildirilmiştir. Yılmaz ve Durmaz'ın (14) Van kedilerinde bu değer, sağ göz için erkek hayvanlarda 2.08 ± 0.08 cm ve dişilerde 2.01 ± 0.10 cm iken sol göz için erkeklerde 2.06 ± 0.07 cm ve dişilerde 2.02 ± 0.10 cm olduğu bildirilmiştir. Erkek Tekir kedilerin incelenen çalışmalardaki diğer kedi ırklarından (14,15) sağ göz için en büyük, sol göz için ise en küçük değere sahip olduğu görülmüştür. Dişi Tekir kediler ise her iki göz için en küçük değere sahiptir.

Gaiddon ve arkadaşlarının (17) yaptığı çalışmada ortalama bir köpeğin corneasının medio-lateral uzunluğu 16-18 mm arasında olduğu belirtilmiştir. Yılmaz'ın (7) farklı köpek ırkları üzerinde yapmış olduğu tez çalışmasında büyük ırk köpeklerde bu değer 20 mm ve küçük ırk köpeklerde ise ortalama 14 mm olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada Tekir kedilerinde cornea'nın medio-lateral uzunluğu erkek hayvanlarda ortalama 15.23 ± 1.21 mm iken dişi hayvanlarda ise ortalama 14.22 ± 1.18 mm uzunluğunda olduğu saptanmıştır.

Köpeklerde yapılan çalışmalarda lens kalınlığının Williams (18) ortalama 6.7 ± 1.0 mm ve Paunksnis ve arkadaşlarının (19) 4.7-6.8 mm arasında değiştiğini bildirmiştir. Yılmaz (7) çalışmasında lens kalınlığının brachycephalic kafa yapısındaki köpeklerde 4.96 ± 0.02 mm iken mesocephalic kafa yapısındaki köpeklerde 7.61 ± 0.13 mm olduğunu bildirmiştir. Yılmaz (7), dokuz farklı köpek ırkı üzerine yapmış olduğu çalışmada en küçük lens kalınlığı değerinin 4.90 mm ile Pomerian ırkı köpeklerde olduğunu belirtirken en büyük lens kalınlığı değeri 8.14 mm ile Kangal ırkına ait olduğu bildirmiştir. Yuwatanakorn ve arkadaşlarının (15) kediler üzerinde yapmış olduğu çalışmada lens kalınlığının ortalama 0.85 ± 0.03 cm olarak ölçmüşlerdir. Yılmaz ve Durmaz (14) Van kedilerinde yapmış oldukları çalışmada 9.6 ± 0.80 mm olduğunu bildirmişlerdir. Ersoy'un (13) yapmış olduğu tez çalışmasında tekir kedilerin oküler ölçümleri ultrasonografik görüntü (US) ve bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleri üzerinden kıyaslanmıştır. Buna göre US görüntülerinde erkek hayvanlarda ortalama 7.76 mm iken dişilerde 7.88 mm olduğu saptanmış; bu değerler BT görüntülerinde erkeklerde 8.33 mm ve dişilerde 8.32 mm olduğu bildirilmiştir. Kanserli kedilerde yapılan bir çalışmada lens kalınlığı 0.88 cm olarak bildirilmiştir (16). Yapılan çalışmada, Tekir kedilerinde ise erkek hayvanlarda ortalama 7.11 ± 0.73 mm iken dişi hayvanlarda ortalama 6.79 ± 0.83 mm olduğu tespit edilmiştir. Tekir kedilerinde lens kalınlığı, Williams (18)'in ve Paunksnis ve arkadaşlarının (19) köpekler üzerinde yapmış oldukları çalışmalarındaki lens kalınlıklarından daha fazladır. Kediler üzerinde yapılmış çalışmalardaki verilere göre Tekir kedilerinin lens kalınlığı en düşük değere sahiptir.

Van kedilerinde yapılan çalışmada (14) lensin dorso-ventral çapı erkek hayvanlarda 1.08 cm iken dişilerde 1.15 cm olduğu bildirilmiştir. Aynı değer kanserli kedilerde yapılan çalışmada (16) 0.88 cm olarak saptanmıştır. Ersoy (13) yaptığı çalışmada US görüntüleri ile erkek hayvanlarda lensin dorso-ventral çapı 13.5 mm iken dişilerde 13.97 mm olarak belirlenmiş olmasına karşın bu değer BT görüntülerinden erkek hayvanlarda 12.21 mm ve dişilerde 11.74 mm olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada bu değer, erkek hayvanlarda 9.83 ± 1.23 mm ve dişi hayvanlarda 9.52 ± 1.00 mm olduğu görüldü. Tekir kedilerinde bu parametre kanserli kediler hariç diğer değerlerden daha düşüktür. Değerlerin genel olarak BT ve US görüntülerinden daha küçük olmasının bir sebebi de formaldehit'in fiksatif etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lensin medio-lateral çapı, Van kedilerinde (14) erkek hayvanlarda sağ göz 2.08 ± 0.08 cm, sol göz 1.11 ± 0.04 cm ve dişi hayvanlarda sağ göz 2.01 ± 0.10 cm, sol göz 1.13 ± 0.07 cm olarak bildirilmiştir. Bu değer kanserli kedilerde (16) 1.25 cm ve köpeklerde yapılan bir diğer çalışmada (20) 1.15 ± 0.08 cm olduğu belirtilmiştir. Bu çap Tekir kedilerinde ise erkek hayvanlarda ortalama 10.32 ± 0.68 mm iken dişilerde 9.71 ± 0.74

mm olduğu tespit edilmiştir. Buna göre yapılan diğer çalışmalara kıyasla lensin medio-lateral çapı Tekir kedilerde diğer hayvanlara göre daha küçük değere sahip olduğu görülmektedir.

Ölçümlerden elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar sonucunda göz küresi hacmi, erkek kedilerde ortalama $4.32 \pm 0.96 \text{ mm}^3$ bulunurken dişi hayvanlarda bu değer $3.29 \pm 1.10 \text{ mm}^3$ olduğu belirlenmiştir. Ersoy (13) tekir kedilerinde yapmış olduğu benzer hesaplama sonucu bu değer bütün kediler için 3.97 mm^3 olarak bildirmiştir. Bu değer aynı çalışmada erkek hayvanlarda 4 mm^3 iken dişilerde bu değer ortalama 3.95 mm^3 olduğu belirtilmektedir. Buna göre yapılan çalışmada Ersoy'un (13) bildirimine uyumlu olarak erkek tekir kedilere ait hacim hesapları daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Tekir kedisinde bulbus oculisine ait morfometrik veriler cinsiyet farklılığı yönünden değerlendirilmiş ve literatürle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak literatür bildirimleriyle paralel olarak ölçülen morfometrik değerler erkek kedilerde ve sağ göz küresinde daha büyük değerlerde olduğu belirlenmiştir. Tekir kedilerinde bölge anatomisinin bilinmesinin bu konuda çalışacaklara ve klinik oftalmolojik müdahalelerde katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

TEŞEKKÜR

Katkılarından dolayı öğrencimiz Şevval Yiğit'e teşekkür ederiz.

FİNANSAL BEYAN

Bu araştırmanın yürütülmesinde herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar tarafından beyan edilecek bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

MK, ŞÖ ve MC çalışmanın planlanması ve örnek toplanmasında görev aldı. DeneySEL çalışmalar MK, ŞÖ ve MC tarafından yürütüldü. Çalışmanın yazılması ve son kontroller bütün yazarların katkılarıyla gerçekleştirildi.

ETİK BEYAN

Bu çalışma, "Hayvan Deneyleri Etik Kurulları Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik" in 8(k) maddesi uyarınca HAD-YEK iznine tabi değildir.

KAYNAKLAR

1. Özudoğru Z, Aksoy G (2005). A macroscopic investigation of the nerves to the eye and ocular annexes in the Van cat. *Vet Res Commun.*, 29:361-371.
2. Demircioğlu İ, Yılmaz B (2019). İvesi koyunlarında (Ovis aries) bulbus oculi'nin morfometrik yapısının incelenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, 12:108-111.
3. Kürtül İ, Türkmenoğlu İ, Pazvant G, Gezer İnce N (2013). Göz (Organum visus). (İçinde): Veteriner Anatomi (Evcil Memeli Hayvanlar). König HE, Liebich HG, Sotonyi P (eds.) 6. Baskı. Medipres Yayıncılık, Malatya, Türkiye, 579-600.
4. Özudoğru Z, Kırış N, Baykalır Y (2024). Kıvrıkcık koyunlarında bulbus oculi'nin morfometrik ve makroanatomik olarak incelenmesi. *MJAVL.*, 14(1):21-29.
5. Okşar D (2017). Akkaraman koyununda bulbus oculi'nin anatomik incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri Üniversitesi, Kayseri.
6. Mitchell N (2010). Examination of the feline eye-functional anatomy. *Vet Nurs J.*, 25(1):17-18.
7. Yılmaz C (2019). Farklı köpek ırklarında bulbus oculi'nin makroanatomik ve taramalı elektron mikroskopik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Samsun Üniversitesi, Samsun.
8. Akın F, Samsar E (1999). Göz Hastalıkları. (İçinde): Anatomi-Fizyoloji. 1. Baskı. Tamer Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 29.
9. Dursun N (2000). Veteriner Anatomi III. Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye, 149-160.
10. Malkoç İ (2006). Göz küresinin tabakaları: anatomik ve histolojik bir derleme. *Eurasian J Med.*, 38:124-129.
11. Toprak M, Akın SM (1998). Anatomi Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 608-640.
12. Nomina Anatomica Veterinaria (2017). International committee on veterinary gross anatomical nomenclature (ICVGAN), Hannover: Published by the Editorial Committee.
13. Ersoy BD (2022). Evcil kedilerde ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi ile oküler biyometri. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
14. Yılmaz O, Durmaz F (2021). Examining the morphometric features of bulbus oculi in Van cats by using computed tomography and magnetic resonance imaging. *Ankara Univ Vet Fak Derg.*, 68:397-406.
15. Yuwatanakorn K, Thanaboonipat C, Tuntivanich N, Darawiroj D, Choisunirachon N (2021). Comparison of computed tomographic ocular biometry in brachycephalic and non-brachycephalic cats. *Vet World.*, 14(3):727-733.
16. Chandrakumar SS, zur Linden A, Owen M et al. (2019). Computed tomography measurements of intraocular structures of the feline eye. *Vet Rec.*, 184(21):651.
17. Gaiddon J, Rosolen SG, Steru L, Cook CS, Peiffer JR (1991). Use of biometry and keratometry for determining optimal power for intraocular lens implants in dogs. *Am J Vet Res.*, 52:781-783.
18. Williams DL (2004). Lens morphometry determined by B-mode ultrasonography of the normal and cataractous canine lens. *Vet Ophthalmol.*, 7:91-95.
19. Paunksnis A, Svaldeniene E, Paunksniene M, Babrauskienė V (2001). Ultrasonographic evaluation of the eye parameters in dogs of different age. *Ultrasonography/Ultrasound*, 39(2):48-51.
20. Salguero R, Johnson V, Williams D et al. (2015). CT dimensions, volumes and densities of normal canine eyes. *Vet Rec.*, 176(15):386.

Ürolitin-A Buzağlarda Gizli Temizlik Skorlarında ve Diyareik Günlerin Sayısında Değişim Sağlayabilir Mi?

Deniz ALIÇ URAL^{1,a,*}

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sultanhisar Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Aydın, TÜRKİYE

ORCID: *0000-0002-2659-3495

✉ Corresponding Author

Deniz ALIÇ URAL

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Sultanhisar Meslek Yüksekokulu,
Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü,
Aydın, TÜRKİYE

alicdeniz@gmail.com

Received

25.03.2025

Accepted

17.06.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1662276

How to cite: Aliç Ural D (2025). Ürolitin-a buzağlarda gizli temizlik skorlarında ve diyareik günlerin sayısında değişim sağlayabilir mi? *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):59-62

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Öz

Ürolitin-A (Ür-a), doğal polifenoller olan elajitanninlerin ve ellagik asitin bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilmesiyle üretilen bir bileşiktir. Bu çalışmada, Ür-a'nın non-enfeksiyöz diyareli buzağlarda dışkı kıvamı (dK) ve gizli temizlik (gT) skorları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Holştayn ırkı 57 buzağıya oral yolla 50 mg/kg dozunda Ür-a içeren nutrasötik müstahzar uygulandı. Çalışma sonucunda, Ür-a uygulaması sonrası dK skorları başlangıçtaki 2-3 aralığından 0-1 aralığına geriledi. Benzer şekilde, gT skorları başlangıçtaki 1-3 değerlerinden 0-1 seviyelerine düştü ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.001). Ayrıca, buzağların farklı zaman dilimlerinde ishalden kurtulduğu gözlemlendi. Ür-a'nın antioksidan, anti-inflamatuar ve immünmodülatör özellikleri göz önüne alındığında, non-enfeksiyöz buzağı ishallerinin destekleyici tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmek yerinde olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, diyare, gizli temizlik skoru, non-enfeksiyöz, ürolitin-a

Can Urolitin-A Alter Latent Clearance Scores and the Number of Diarrheal Days In Calves?

Abstract

Urolitin-A (Ur-a) is a compound produced by the metabolism of natural polyphenols ellagitannins and ellagic acid by the intestinal microbiota. In this study, the effects of Ur-a on fecal consistency (fC) and latent cleanliness (IC) scores in calves with non-infectious diarrhea were evaluated. A nutraceutical preparation containing Ur-a was administered orally to 57 Holstein calves at a dose of 50 mg/kg. As a result of the study, after Ur-a administration, fC scores decreased from the initial 2-3 range to the 0-1 range. Similarly, IC scores decreased from the initial 1-3 values to the 0-1 levels and this change was found to be statistically significant (P<0.001). In addition, it was observed that the calves recovered from diarrhea at different time periods. Considering the antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties of Ur-a, it would be appropriate to suggest that it can be used as a potential agent in the supportive treatment of non-infectious calf diarrhea.

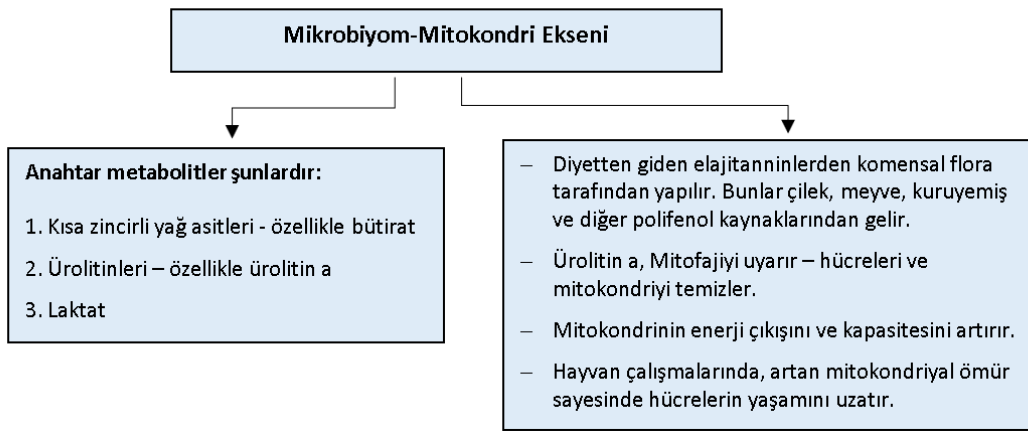
Key Words: Calf, diarrhea, latent clearance score, non-infectious, urolithin-a

GİRİŞ

Ürolitin-A (Ür-a), kimyasal yapısında a-benzo-kumarin iskeleti içeren ürolitin ailesine ait bir bileşiktir. Nar başta olmak üzere, çilek, ceviz gibi besinlerde bulunan doğal polifenoller olan Ellagitaninler ve Ellajik Asitin mikrobiyom aracılığıyla kolon içinde dönüşümü sonrasında Ürolitinler (özellikle Ür-a) üretilir (1,2). Yapılan araştırmalarda bağırsak florası bozulmuş bazı insanlarda Ür-a'nın üretilmediği saptanmıştır. Buna çözüm olarak son yıllarda ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından Ür-a satışı onaylanmıştır. Ancak bazı çalışmalarda oral olarak alınan Ür-a'nın yeterli mitofajik etki göstermeyeceği ispat edilmiştir (1,2).

Mitofaji (mitokondriyal otofaji), hasarlı mitokondrilerin otofaji yoluyla ortadan kaldırılması ve hücrel geri dönüşüme katılması olayıdır. Bu süreç Ür-a'nın aktive edebileceği

bazı yollar üzerinden ilerlemektedir (Şekil 1). Mitofaji genellikle hasar veya stresi takiben kusurlu mitokondrilerde görülür. Hasar görmüş mitokondri LC3 ve PINK1 proteinleri ile etkilenir. Bu proteinler mitokondriyi otofagosoma çevirmeye görevlidir. Oluşan otofagosom, hücrenin sindirim organeli olan lizozom ile birleşir. Bu birleşme gerçekleştiğinde, meydana gelen yapı otofagosom-lizozom füzyonu adını alır. Burada mitokondriler enzimler ile parçalandıktan sonra daha küçük bileşenlere dönüşür ve hücre tarafından kullanılmak veya atılmak üzere bileşenler değerlendirilir (4). Şekil 1'de mikrobiyom-mitokondri ilişkisi ve Ür-a'nın rolü sunulmaktadır.



Şekil 1. Mikrobiyom-mitokondri eksenini ve Ür-a'nın önemi

Bu çalışmada, Ür-a'nın non-enfeksiyöz diyareli buzağılarda dışkı kıvamı (dK) ve gizli temizlik (gT) skorları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Çalışma kapsamına Holştayn ırkı 57 buzağı (44 dişi, 13 erkek, 9-37 günlük yaşlarda) dahil edildi. Her buzağıda bilgi onam formu temin edilirken, hasta sahiplerinden gerekli izinler alındı.

Non-Enfeksiyöz Diyare Tanısına Yönelik Algoritma

Non-enfeksiyöz ishal tanısına yönelik algoritma (5) bu çalışmada dahil edilme ya da dışlama kriterlerinin oluşturulmasında baz teşekkül etmiştir. İlgili algoritma buzağılarda yaş dağılımına yönelik enfeksiyöz hastalıkların ve buna sebep olan etmenlerin dağılımları ile en erken tespit edilebilir günlerine dayandırılmaktadır. Bu kapsamda ilgili testlerin varlığı ile enfeksiyöz/non-enfeksiyöz diyarenin buzağılarda ayırıcı tanısına yaklaşılmaktadır. Nitekim bu çalışmada ilgili günlere göre hasta başı hızlı test kitleri, dışkıda antijen tarama, dışkı mikrobiyolojisi, parazitolojisi ve PCR tanısal metodolojisi (5) sayesinde enfeksiyöz etiyolojik tanısı bulunan tüm buzağılar çalışma dışında tutulmuştur.

Dışkı Kıvamının Belirlenmesi

Dışkı Kıvamı 0-3 arası (dışkı skoru 0 = normal kıvam, 1 = yarı şekillenmiş veya pasta görünümlü, 2 = gevşek karakterde ve

3=sulu dışkı) değerlendirildi. Dışkı skoru $\geq 2-3$ olan tüm buzağılar diyareik olarak sınıflandırıldı (6).

Gizli Temizlik Skorlaması

Gizli Temizlik skorlaması ilgili literatür (7,8) baz alınarak gerçekleştirildi. Skor 0= Baldır ve tüm vücut tamamen temiz, buzağı üzerinde ve/veya alt bacaklarda dışkı kalıntısı ya yok/çok az ile skor 3= Kuyruğun başı, buzağının arka taraftan görünen son kısmı ve baldır ile bacaklar dışkı ile bulaşık/kirli olmak üzere yorumlandı (7,8)

Bu çalışmada Urolithin A Mitochondria Support (DQQL) (Ür-a 3000 mg, nar ekstraktı 500 mg, resveratrol 300 mg, vitamin C 20 mg, kolajen peptidler 180 mg) isimli Ür-a içeren nutrasötik müstahzar tercih edilmiş ve 50 mg/kg dozda oral yolla 10 gün boyunca günde 1'er kez kullanılmıştır. Bu kapsamda gerek dK gerekse gT skorlamaları, Ür-a uygulamasına ilişkin olarak çalışma başlangıcında (0. gün) ve sağaltım sonunda (10. gün) tekrarlayan ölçüme tabi tutulmuştur.

İstatistiksel Analizler

Elde edilen skorlama verilerin sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası değerlendirmeleri sonrasında ortalama ortanca ve standart sapma değerleri tanımlayıcı istatistikler kapsamında hesaplanıp tablollaştırıldı. Sağaltım öncesi ve sonrası skorların karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testinden yararlanıldı. Verilerin görselleştirilmesinde ggplot paketi kullanılarak grafitizasyon işlemleri R studio kullanılarak gerçekleştirildi ve P değerinin 0.05 den küçük olduğu durumlar istatistiksel anlamlı kabul edildi.

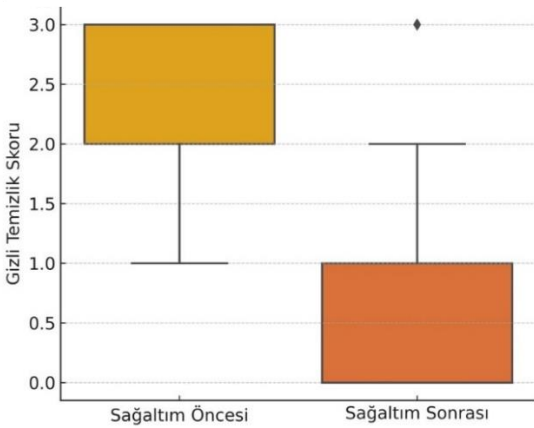
BULGULAR

Yukarıda gereç ve yöntem bölümünde de bahis konusu olduğu üzere dK ile gT skorları 0-3 puanlar arasında irdelendi. 57 diyareik buzağlarda 2-3 arası tespit edilen çıkış değerleri Ür-a uygulaması sonrası 0 ile 1 arasında kısıtlı değişim göstermekteydi. Diğer yandan gT skorlarına bakıldığında çıkış değerleri diyareik buzağlarda 1-3 arası değişirken, Ür-a verildikten sonra 0-1 arası değişim gösterdi. Ortalama, ortanca ve standart sapma açısından gT skorları başlangıçta sırası ile 2.5, 3 ve 0.6 olarak belirlenirken; Ür-a uygulamasıyla beraber yine sırası ile 0.6, 0 ve 0.9 olarak saptandı (Tablo 1 ve Grafik 1). Ür-a uygulamasına ilişkin olarak gT skorlarında sağaltım sonu istatistiksel olarak belirgin fark saptandı ($P<0.001$) (Tablo 1).

Tablo 1. Gizli temizlik skorlarına ilişkin istatistiksel değerlendirme.

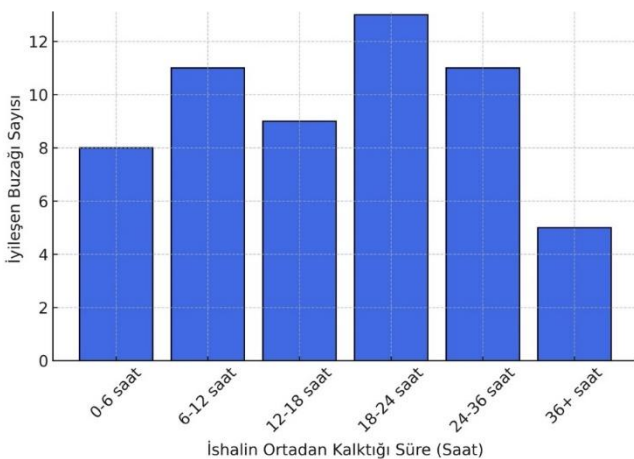
Gizli Temizlik Skoru	Ortalama	Ortanca	Std. Sapma	P değeri
Önce (0. gün)	2.5	3	0.6	0.001
Sonra (10. gün)	0.6	0	0.9	

Grafik 1. gT skorlarına ilişkin boks plot gösterimi



Toplamda çalışmaya dahil edilen 57 buzağından 8'inde 0.-6., 11'inde 6.-12., 9'unda 12.-18., 13'ünde 18.-24., 11'inde 24-36. saatler ve kalan 5'inde de 36. saatlerden sonra ishalin ortadan kalktığı gözlemlendi (Grafik 2).

Grafik 2. Buzağlarda Ür-a uygulaması ile birlikte ishalli gün sayısında değişimine ait grafik



TARTIŞMA VE SONUÇ

Ür-a'nın vücuttaki genel etkilerine ve literatür tartışmasına değinmek yerinde olacaktır. Serbest radikalleri nötralize eden, hücrelere ve dokulara oksidatif stres hasarını azaltan güçlü bir antioksidan olarak Ür-a öne çıkmaktadır. Antioksidan özellikleri (9) onu oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir uygulama haline getirmektedir. İnflamatuar yanıtı azaltmada, inflammatuar hücrelerin aktivasyonunu ve inflammatuar faktörlerin salınmasını engellemeye yine Ür-a rol alabilmektedir (10-13). Bu durum esas olarak inflamasyonla ilişkili sinyal yollarının düzenlenmesine katılarak ve inflammatuar sitokinlerin sentezini inhibe ederek elde edilir (10, 12, 13). İnflamatuar yanıtın ve inflammatuar mediatörlerin salınımını engelleyebilen bariz bir anti-inflamatuar etki gösterebilmektedir. Bu, Ür-a'yı inflamasyon ile ilişkili hastalıkların (inflammatuar bağırsak hastalığı vb.) sağaltımında potansiyel olarak yararlı kılar. Antibakteriyel etki açısından Ür-a, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve diğer yaygın patojenik bakteriler gibi çeşitli bakterileri öldürebilir. Bakteriyel hücre zarını yok ederek ve bakteriyel enzim aktivitesini inhibe ederek antibakteriyel etki göstermektedir. Antiviral etki yönünden Ür-a hepatit B virüsü, HIV virüsü vb. dahil olmak üzere birçok virüsün replikasyonunu ve enfeksiyonunu engelleyebilir. Çalışmalar, Ür-a'nın virüsün dış zarını tahrip ederek konakçı hücrelere girmesini ve çoğalmasını önleyebildiğini göstermiştir. Yine Ür-a'nın *Candida albicans* ve *Cryptococcus* gibi çeşitli mantarlar üzerinde de antifungal etkisi vardır. Mantar hücre zarlarını bozarak, enzimatik aktivitelerini inhibe eder ve DNA replikasyonunu bloke ederek fungal çoğalmayı engeller. İmmünomodülatör etki yönünden Ür-a bağışıklık sisteminin fonksiyonunu artırabilir, bağışıklık hücrelerinin aktivitesini düzenleyebilir ve antikor üretimini artırabilir (10). Yine Ür-a'nın kolon fibroblastları üzerinde NF-kb'yı inhibe etmesi gastrointestinal etkinliğine delalettir (11). Bu çalışmada her ne kadar sitokin analizi ya da gastrointestinal biyobelirteç tayini yapılamasa da, gT ve dK'na ait skorlamalar gerçekleştirilerek gastrointestinal sağlık durumunun tespitine uğraşıldı. Bu çalışmada bütçe yetersizliği nedeniyle herhangi bir inflammatuar ya da oksidatif stres süreçlerine ilişkin analiz gerçekleştirilemedi de, yukarıdaki literatür bilgisi ile Ür-a'ya ait olası mekanizmalar tartışıldı.

Önceki bir araştırmada silikon dioksitin diyareik (n=14) ve non-diyareik (n=12) buzağlarda gT skoru üzerine etkinliği araştırılmıştır. Her 2 gruptaki buzağlara silikon dioksit oral yolla 10'ar gr olarak 1 hafta verilmiştir. Yapılan ilgili araştırmada gT diyareik buzağlarda 2-3 arası değişirken, silikon dioksit sağaltımı ile 0-1 arasında değişmiş ve önerilen dozda etkili olabileceğini göstermiştir (14). Daha da önceden gerçekleştirilen bir başka saha araştırmasında 4 farklı çiftlikten toplamda n=19 buzağıda (dışkı skoru $\geq 2-3$ olanlar diyareik olarak değerlendirilmiş) zerdeçal ile sağaltım sonrası gT skorlarının, çıkış değerlerine göre belirgin istatistiksel farklılık ($P<0.001$) gösterdiği tespit edilmiştir. İlgili çalışmada kurkuminin geçirgen bağırsak azalttığı da tespit edilmiştir (15). Bu çalışmada 57 buzağıda Ür-a uygulaması öncesi ortalama ve ortanca gT skorları başlangıçta sırası ile 2.5 ve 3, sağaltım sonrası ise 0.6 ve 0 ve 0.9 olarak saptandı (Tablo 1 ve Grafik 1) ($P<0.001$). İshali gün sayısı açısından değerlendirmede 57 buzağından 8'inde 0.-6., 11'inde 6.-12., 9'unda 12.-18., 13'ünde 18.-24., geride kalan 16'sında ise 24->36. saatlerden

sonra ishalin ortadan kalktığı gözlemlendi (Grafik 2). İlk 12 saat içerisinde 19 buzağıda, ilk 24 saat boyunca da toplamda 41 buzağıda ishalin ortadan kalkması sağaltım başarısı ile ilişkilendirilebilir.

Ür-a'nın ellajik asiti ürolitine çeviremeyen bireylerde bağırsak mikrobiyomunu değiştirmede, bunun da muhtemelen ilgili çalışmanın kendisinde düşük dozda uygulamanın etkisinden kaynaklabileceği bildirilmiştir (16). Ür-a'nın yüksek dozlarda bağırsak mikrobiyomunu değiştirip, değiştirmedine ilişkin çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede ancak ellajik asidi Ür-a'ya çeviren bağırsak mikrobiyomuna ait doğal dönüşümün hangi oranda gerçekleştiği tespit edilebilecektir (17).

Ürolitinlerin genel olarak toksisite çalışmaları dahilinde güvenli kabul edilmeleri (18, 19) ile birlikte ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından Ür-a'nın genellikle güvenli kabul edilebilir sınıflandırması önem arz etmektedir. Bu sebeple bu çalışma öncü olabilecek, ardından bu alanda aynı doğal bileşen ile buzağılarda farklı başlıklarda araştırmalara yön verebilecektir.

Elajitanninlerin ve ürolitinlerin antioksidan (9), anti-inflamatuvar (12, 13) ve immunomodülatör (10) özellikleri göz önüne alındığında, her ne kadar bu çalışmada ilişkili biyobelirteçler tayin edilemese de, saha koşullarında bu çalışma dahilinde uygulandığı dozlarda non-enfeksiyöz buzağı ishallerinde kullanılabileceğini öne sürmek yerinde olacaktır.

FİNANSAL BEYAN

Bu araştırmanın yürütülmesinde herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar tarafından beyan edilecek bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışmanın tüm aşamaları DAU tarafından yürütülmüştür. Yazar, çalışmanın tasarımı, veri toplama, analiz ve yorumlanması, makalenin yazımı ve revizyonundan sorumludur.

ETİK BEYAN

Her buzağıda bilgi onam formu temin edilirken, hasta sahiplerinden gerekli izinler alındı. Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK belge no: 64583101/2024/119) onayı temin edildi.

KAYNAKLAR

- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A et al (2001). Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr.*, 131(11):2837–2842.
- Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B et al (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.*, 48(10):4581–4589.
- D'Amico D, Andreux PA, Valdés P et al (2021). Impact of the natural compound urolithin A on health, disease, and aging. *Trends Mol Med.*, 27(7):687–699.
- Zhao H, Song G, Zhu H et al (2023). Pharmacological effects of urolithin A and its role in muscle health and performance: Current knowledge and prospects. *Nutrients.* 15(20):4441.
- Vaatstra B (2018). Calf diarrhoea diagnostics. *VetScript.*, 31(9):54-57.
- McGuirk SM (2008). Disease management of dairy calves and heifers. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 24(1):139–153.
- Panivivat R, Kegley EB, Pennington JA et al (2004). Growth performance and health of dairy calves bedded with different types of materials. *J Dairy Sci.*, 87(11):3736–3745.
- Sutherland MA, Worth GM, Stewart M (2014). The effect of rearing substrate and space allowance on the behavior and physiology of dairy calves. *J Dairy Sci.*, 97(7):4455–4463.
- Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI et al (2009). Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem.*, 57(21):10181–10186.
- Toney AM, Fox D, Chaidez V et al (2021). Immunomodulatory role of urolithin A on metabolic diseases. *Biomedicine.*, 9(2):192.
- González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT et al (2010). Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res.*, 54(3):311–322.
- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ et al (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem.*, 21(8):717–725.
- Jing T, Liao J, Shen K et al (2019). Protective effect of urolithin A on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, 129:108–114.
- Aliç Ural D (2024). Oral yolla silikon dioksit uygulanan ishallerli buzağılarda fekal yansıma ile gizli temizlik skorlarında değişim sağlanabilir mi?. *SBGY.*, 5(3):111–115.
- Aliç Ural D (2024). Kurkuminin oral yolla yem katkısı olarak kullanımının ishallerli buzağılarda zonulin seviyeleri ile dışkı kıvamı ve hijyen skoru üzerine etkinliğinin araştırılması: Kohort çalışması. *Türkiye Klinikleri Vet Bilim Derg.*, 101599:1–17.
- Nishimoto Y, Fujisawa K, Ukawa Y et al (2023). Effect of urolithin A on the improvement of vascular endothelial function depends on the gut microbiota. *Front Nutr.*, 9:1077534.
- Kuerec AH, Lim XK, Khoo AL et al (2024). Targeting aging with urolithin A in humans: A systematic review. *Ageing Res Rev.*, 102406.
- Heilman J, Andreux P, Tran N et al (2017). Safety assessment of Urolithin A a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol.*, 108:289–297.
- Singh A, Andreux P, Blanco-Bose W et al (2018). Translating urolithin A benefits on muscle mitochondria to humans. *Innov Aging.*, 2:92.

Investigation of the Effect of Screw Fixation of Sacroiliac Luxation on Pelvic Canal Width Ratio in Cats

Hatice Elif SEVER^{1,a}, İrem Sü SATICI^{1,b}, Zeynep ÇİMEN^{1,c}, Nuriza Zamirbekova ERDOĞAN^{1,d}, Mustafa ARICAN^{1,e}

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, TÜRKİYE

ORCID: ^a0009-0006-5067-6609, ^b0009-0003-5258-2989, ^c0009-0004-1089-0163, ^d0000-0003-4465-5511, ^e0000-0001-8180-135X

✉ Corresponding Author

Mustafa ARICAN

Department of Surgery, Faculty of
Veterinary Medicine, Selçuk
University, Konya, TÜRKİYE

marican@selcuk.edu.tr

Received

18.02.2025

Accepted

17.06.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1642349

How to cite: Sever HF, Satıcı İ, Çimen Z, Erdoğan NZ, Arıcan M (2025). Investigation of the Effect of Screw Fixation of Sacroiliac Luxation on Pelvic Canal Width Ratio in Cats. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):63-70.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Abstract

The aim of this study was to evaluate the pre- and postoperative effects of screw stabilization on the inter-ilium distance, pelvic canal width, and hemipelvic canal ratios in cats that developed sacroiliac luxation as a result of trauma. The study included 18 cats of different breeds, sexes, ages and weights that were diagnosed with sacroiliac luxation due to trauma and underwent surgical intervention at the Selçuk University Small Animal Hospital between 2023 and 2024. Clinical, hematological, and radiological examinations were performed. Following medical treatment and rehabilitation of the patients requiring stabilization before surgery, screw fixation was applied between the ilium and sacrum to stabilize the sacroiliac luxation. Among the 18 cases, 16.6% had bilateral sacroiliac luxation, 16.6% had sacroiliac luxation with an ilium fracture, 16.6% had sacroiliac luxation with an ischium fracture, 11.1% had sacroiliac luxation with a pubis fracture, 11.1% had sacroiliac luxation with both pubis and ischium fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with an acetabulum fracture, 5.6% had sacroiliac luxation with both acetabulum and ilium fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with both ilium and ischium fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with pubis and ilium fractures accompanied by femoral head luxation, and 5.6% had sacroiliac luxation with pubis, ilium, ischium, and symphysis pelvis fractures. In 84% of the 18 cases diagnosed with sacroiliac luxation and treated surgically, the postoperative pelvic canal width ratio (PCWR) was found to be ≥ 1.1 . No statistically significant difference was observed between the pre- and postoperative inter-ilium distance and pelvic canal ratios. However, a statistically significant difference was found in the hemipelvic canal ratio between the pre- and postoperative measurements ($P < 0.05$). In this study, the comparison of pre- and postoperative results showed that the inter-ilium distance, pelvic canal, and hemipelvic canal ratios approached a normal anatomical structure postoperatively. In the choice of surgical technique, the dorsal approach to expose the ilium body facilitated the application.

Key Words: Hemipelvic canal ratios, ilium distance, pelvic canal ratio, screw fixation

Kedilerde Sakroiliak Luksasyonun Vida Fiksasyonu ile Tedavisinin Pelvik Kanal Genişliği Oranına Etkisinin Araştırılması

Öz

Bu çalışmanın amacı, travmalar sonucu sakroiliak çıkık gelişen kedilerde, vida stabilizasyonunun iki ilium arası mesafe, pelvik kanal genişliği ve hemipelvik kanal oranları üzerindeki etkilerini pre ve postoperatif olarak değerlendirmektir. Çalışma materyalini 2023-2024 yılları arasında Selçuk Üniversitesi, Küçük Hayvan Hastanesi'ne travma sonucu sakroiliak çıkık oluşan ve cerrahi girişim gerçekleştirilen farklı ırk, cinsiyet, yaş, ağırlıkta 18 kedi oluşturdu. Klinik, hemogram ve radyolojik muayeneleri yapıldı. Operasyon öncesi medikal tedaviye ihtiyaç duyan hastaların rehabilitasyonlarından sonra sakroiliak çıkıklarda ilium ile sakrum arasında vida stabilizasyonu yapıldı. 18 olgunun %16.6'sında bilateral sakroiliak çıkık, %16.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde ilium kırığı, %16.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde ischii kırığı, %11.1'inde sakroiliak çıkık beraberinde pubis kırığı, %11.1'inde sakroiliak çıkık beraberinde pubis ve ischii kırığı, %5.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde acetabulum kırığı, %5.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde acetabulum ve ilium kırığı, %5.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde ilium ve ischii kırığı, %5.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde pubis ile ilium kırığı ve caput femoris luksasyonu, %5.6'sında sakroiliak çıkık beraberinde pubis, ilium, ischii ve symphysis pelvina kırığı olduğu belirlendi. Sakroiliak çıkık teşhisi konulan ve cerrahi girişim uygulanan 18 olgunun %84'ünde operasyon sonrası pelvik kanal genişliği oranı (PKGO) ≥ 1.1 olarak bulunmuştur. Cerrahi girişim öncesi ve sonrası iki ilium arası oran arasında ve pelvik kanal oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak, operasyon öncesi ve sonrası hemipelvik kanal oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Yapılan çalışmada pre ve postoperatif sonuçlarının karşılaştırılmasında, iki ilium arası, pelvik kanal ve hemipelvik kanal oranları post-op dönemde sağlıklı anatomik yapıya yaklaştığı gözlemlendi. Seçilecek cerrahi teknikte, olguların corpus ilium'a dorsal yaklaşım ile açığa çıkarılması uygulama kolaylığı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Hemipelvik kanal oranları, ilium mesafesi, pelvik kanal oranları, vida fiksasyonu

INTRODUCTION

Pelvic fractures in cats account for approximately 32% of all fractures (1). Of these, 59-93% are associated with sacroiliac luxation, and 27-46% are bilateral (1-3). Sacroiliac luxation is the separation of the wing of ilium from the sacrum (4) and can sometimes be associated with sacral fractures (5). Unilateral sacroiliac dislocation can only occur with concomitant pelvic fractures due to the rigid structure of the pelvic ring (6). Common fracture combinations include sacroiliac dislocation with symphysis pubis separation, pubic bone, pubic bone combined with ischial fractures, sacroiliac dislocation with contralateral wing of ilium and pubic fractures (1,6). Although bilateral sacroiliac luxation can occur without concomitant pelvic injury, it is often associated with pubic fractures in cats (1). In a study of 103 feline pelvic fractures, it was found that 90% of the fractures occurred in the pelvic floor (Symphysis pubis, ischial, pubic body). Sixty percent of these cases were sacroiliac dislocations, and 48.5% were iliac fractures (3).

Initially, cage rest was recommended for the treatment of sacroiliac dislocation. However, more recent surgical interventions have been shown to lead to faster recovery times and to be more comfortable for the patient during both the recovery period and the postoperative period (7-9). Some researchers advocate surgical stabilization in all cases of sacroiliac joint dislocation, emphasizing that the sacroiliac joint is part of the weight-bearing axis of the pelvic limb (10,11). Furthermore, there is insufficient evidence to support conservative management of sacroiliac joint dislocation (1,11). Indications for conservative management include no need for patient assistance, less than 50% displacement of the articular surface, minimal pain and instability, no concomitant fractures along the weight bearing axis, absence of certain neurological problems and less than 45% narrowing of the pelvic canal (1,11-13).

Conservative management of sacroiliac luxation in cats typically involves cage rest for 2-4 weeks, analgesic management, and monitoring of urination and defecation (13). There are some reports of conservative management of sacroiliac luxation (1,14,15). In a retrospective study of 16 cats, good results were obtained after a short follow-up (4 weeks) and no lameness was observed (14). However, complications associated with conservative management include pelvic canal stenosis, displacement of pelvic fragments leading to constipation or obstipation (16), and prolonged recovery times (11). It has been suggested that ankylosis and degenerative changes may develop in the sacroiliac joint, adversely affecting mobility (17). Conservative treatment may be considered in cases of sacroiliac dislocation with minimal displacement. However, conditions that result in pelvic canal narrowing, pain that negatively affects the patient's quality of life, or displacement or neurological dysfunction that affects gait are indications for surgical stabilization (18,19).

Recently, surveys have been used to evaluate outcomes of surgically stabilized unilateral and bilateral sacroiliac luxation (20,21) and femoral head and neck resections in cats (22). Internal fixation as a surgical procedure reduces pain, hospital stay and postoperative recovery time (23). A single screw or two screws can be used for fixation. In addition, lag screws with Kirschner wire can be used (24,25).

The aim of this study is to evaluate the effects of screw stabilization on the iliopelvic distance, pelvic canal width and

hemipelvic canal ratio in cats with sacroiliac luxation resulting from various traumas, comparing pre and postoperative results.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out on 18 cats of different breeds, sex, age and weight that were referred to the Small Animal Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine of Selçuk University between 2023 and 2024 with a diagnosis of sacroiliac luxation due to various traumas and underwent surgical intervention (Table 1). Clinical, hemogram and radiological examinations were performed. If the cats were treated before surgery for any medical condition (infection, acidosis or alkalosis), and then screw stabilisation between the ilium and sacrum was performed for sacroiliac dislocations.

Table 1. Medical history of cats with sacroiliac dislocation due to various traumas and surgery of different breed, sex, age and weight

Num ber	Breeds	Gen- ders	Age	Disloca- tion	Anamnesis
1	Turkish Angora	Fe- male	3	Right	Falling down from height
2	Scottish Fold	Fe- male	5	Bilateral	Falling down from height
3	British Shorthair	Male	2	Right	Traffic accident
4	Mixed breed	Male	3	Right	Falling down from height
5	Mixed Breed	Fe- male	3	Left	High energy trauma
6	British Longhair	Male	2	Right	Falling down from height
7	Brazilian Shorthair	Fe- male	4	Right	Traffic accident
8	Mixed Breed	Fe- male	2	Right	Falling down from height
9	British Shorthair	Male	1	Bilateral	Falling down from height
10	Mixed Breed	Male	6	Right	Falling down from height
11	Mixed Breed	Male	8	Left	Traffic accident
12	Brazilian Short-hair	Fe- male	6	Bilateral	Falling down from height
13	Mixed Breed	Fe- male	5	Bilateral	Falling down from height
14	British Longhair	Fe- male	9	Left	Falling down from height
15	Bombay	Male	2	Right	Falling down from height
16	British Shorthair	Male	2	Right	Falling down from height
17	Mixed Breed	Male	3	Bilateral	Falling down from height
18	British Shorthair	Male	5	Left	Falling down from height

Blood Examination

Blood collected from the cephalic vein. A Radiometer blood gas analyser (ABL90 series, Denmark) and a Biotecnica biochemical analyser (BT3000 Plus, Italy) were used for blood gas measurements.

Radiographic Examination

For radiographic examination, the Siemens single-tube fixed radiography unit (model: 483388, China) available in the clinic was used. Direct orthogonal radiographs were taken in ventro-dorsal, latero-lateral positions depending on the region of interest, preoperative and postoperative metric

measurements between the sacrum and the sagittal plane, as well as measurements between the acetabulum and the sagittal plane, were taken during the radiographic examination. Pelvic canal width ratio (PCWR): This is the ratio between the width of the pelvis in the cranial direction of the acetabulum and the caudal width of the sacrum. A PCWR ≥ 1.1 was considered normal (20). The preoperative pelvic canal ratio, the hemipelvic canal ratio and the distance between the iliac bones were measured for the cases.

Medical Treatment

As a result of the examination and analysis, medical treatment (infection, acidosis or alkalosis e.g) was given to patients with general health problems (trauma procedur e.g) and patients were prepared for surgery.

Surgical Procedure

Pre-anesthetic Domitor 80 µg/kg (Domitor®, Orion Pharma, Finland) was injected intramuscularly together with butorphanol 0.4 mg/kg (Butomidor® 10mg/ml, Richter-Pharma, Austria), an analgesic and sedative pre-anesthetic. Anaesthesia was induced with propofol (2-4 mg/kg). After induction, the endotracheal tube was placed and anaesthesia was maintained with isoflurane (%1.5-4) Isoflurane 100 mL, Adeka İlaç, Türkiye) at a concentration of 1.5-1.8%.

Surgical approach to the ilium wing and the dorsal surface of the sacrum

Two methods were used to approach the iliac spine. First, the locations of the dorsal iliac spine and the caudal iliac spine on the lateral surface of the iliac body were determined. The caudal 1/3 of this area was considered and the point where it met the ventral iliac spine was calculated. Starting from the ilium wing, the area continuing to the corpus was divided into two equal parts. The junction of the region where the line from the dorsal iliac spine divides the iliac body was chosen as the ideal area for drilling. A screw of appropriate length (60% of sacrum lenght) was advanced until its tip was on the medial surface of the ilium. The ilium was aligned caudally with the articular surface of the sacroiliac joint. The tip of the screw was directed into the pre-prepared groove hole in the sacrum and the screw was tightened.

Dorsal approach to the ilium body

A dorsal approach was used to access the body of the ilium, allowing exposure of L7, the sacrum, and the luxation site. The incision started cranially at the dorsal iliac spine and continued caudally in a line parallel to the midline towards the hip joint. The sacroiliac joint was exposed and Hoffman elevator were used to enter between the ilium and sacrum. The fibrous cartilaginous articular surfaces of the sacrum were exposed. A hole was made 2 mm cranially and 2 mm proximal to the center of the articular cartilage. The depth of the hole in the sacral corpus was adjusted to allow the tip of the screw to extend to the median line of the corpus sacrum. Radiographs were taken before completion of surgery to assess the position of the screws.

Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk test was applied and the normality assumption was found to be satisfied ($P > 0.05$). This result indicates that the data followed a normal distribution. Therefore, paired sample t-tests were used to compare the means of the preoperative and postoperative results.

RESULTS

Clinical Results

The sex distribution of the cats that underwent surgery was as follows: 55.6% males and 44.4% females. In terms of breed distribution, 50% of the cats were mixed breed (Tabby), 33.4% were British Shorthair, 5.6% were Scottish Fold, 5.6% were Bombay, and 5.6% were Ankara cats. Postoperative clinical follow-up of the cases in this study showed a good prognosis. There were no problems with neurological dysfunction, defecation or urination.

Radiological Results

In the 18 cases diagnosed with sacroiliac dislocation, the distribution of associated fractures and dislocations was as follows 16.6% had bilateral sacroiliac luxation, 16.6% had sacroiliac luxation with an ilium body fracture, 16.6% had sacroiliac luxation with an ischial fracture, 11.1% had sacroiliac luxation with an pubic bone fracture, 11.1% had sacroiliac luxation with both pubis and ischium fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with an acetabular fracture, 5.6% had sacroiliac luxation with both acetabular and iliac fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with both iliac and ischium fractures, 5.6% had sacroiliac luxation with pubic and iliac fracture and femoral head luxation, 5.6% had sacroiliac luxation with pubis, ilium, ischium and pelvic symphysis fractures.

Preoperative and postoperative measurements of sacrum-sagittal distance, acetabulum-sagittal distance and pelvic canal width ratio (PCWR) are shown in Figures 1, 2 and 3 and Table 2.

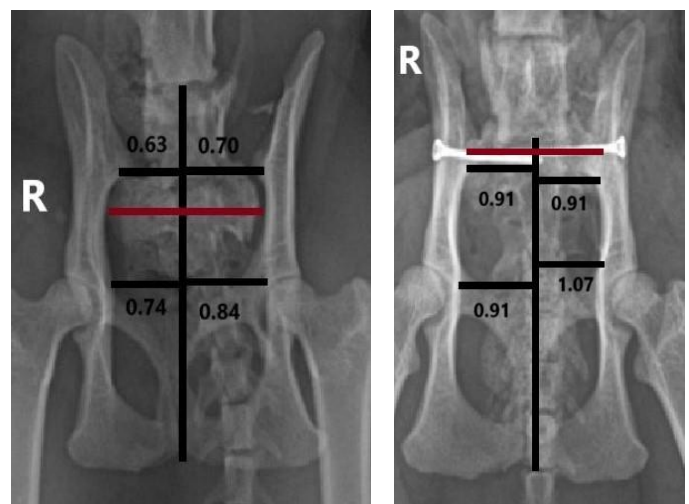


Figure 1. Pre and postoperative images of the 12th case with a bilateral luxation of the right sacroiliac joint.

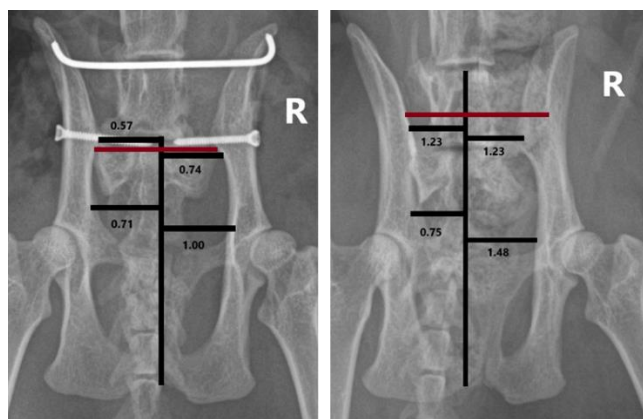


Figure 2. Pre and postoperative images of the 2th case with a bilateral sacroiliac joint luxation and a fracture of the pubic bone.

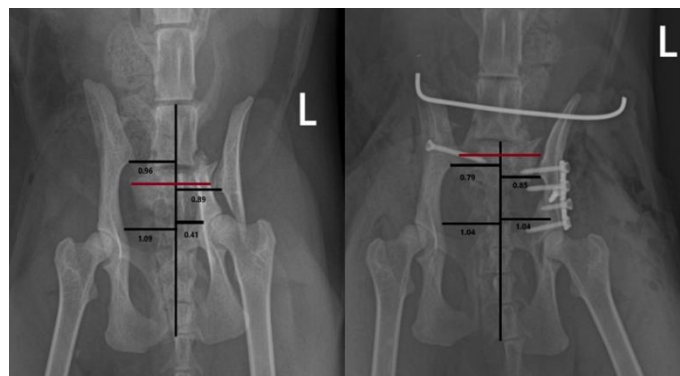


Figure 3. Pre and postoperative images of the 13th case with bilateral sacroiliac luxation and left ilium fracture

Table 2. Preoperative and postoperative sacrum-sagittal plane distance, acetabulum-sagittal plane distance, and pelvic canal width ratio (PCWR) values of the cases.

No	Preoperative sacrum-sagittal plane distance (R\L)	Postoperative sacrum-sagittal plane distance (R\L)	Preoperative acetabulum-sagittal plane distance (R\L)	Postoperative acetabulum-sagittal plane distance (R\L)	Preoperative (PCWR)	Postoperative (PCWR)
1	0.84\0.42	0.79\0.74	0.88\0.81	0.96\0.81	1.34	1.16
2	1.23\1.23	0.74\0.57	1.48\0.75	1.00\0.71	0.9	1.3
3	0.93\0.58	0.90\0.49	1.07\0.88	1.02\0.83	1.15	1.33
4	1.39\0.96	1.40\1.35	1.64\1.05	1.19\1.72	1.14	1.05
5	0.64\0.86	0.88\0.84	0.88\0.24	1.02\1.06	0.75	1.20
6	1.48\1.14	0.67\0.72	1.95\1.00	0.48\0.88	1.13	0.98
7	0.84\0.47	0.76\0.68	0.79\0.67	0.40\0.74	1.11	0.8
8	1.03\0.56	0.61\0.61	0.91\0.63	0.72\0.82	0.97	1.26
9	1.07\0.91	1.16\1.09	1.16\0.89	1.35\1.18	1.04	1.12
10	0.66\0.48	0.67\0.67	0.68\0.45	0.59\0.71	1	0.98
11	0.81\0.74	1.39\1.53	0.77\1.01	1.77\1.80	1.15	1.2
12	0.63\0.70	0.91\0.91	0.74\0.84	0.91\1.07	1.19	1.09
13	0.96\0.89	0.79\0.85	1.09\0.41	1.04\1.04	0.81	1.27
14	0.96\1.23	1.12\1.37	1.07\1.46	1.58\1.54	1.56	1.25
15	0.82\0.64	1.02\1.00	0.73\0.87	1.29\0.95	1.11	1.11
16	1.23\1.17	0.76\0.61	1.44\0.54	0.89\0.91	0.83	1.31
17	0.93\0.84	1.38\1.51	1.09\0.46	1.52\1.78	0.88	1.14
18	1.12\1.91	1.16\1.24	1.19\1.98	1.54\1.67	1.05	1.34

Preoperative pelvic canal ratio, hemipelvic canal ratio and distance between the iliums of the cases (Table 3). Postoperative pelvic canal ratio, hemipelvic canal ratio and distance between the iliums of the cases (Table 4). There was no statistically significant difference between the pre and postoperative distance between the two iliums ($p > 0.05$). Similarly, there was no statistically significant difference between the pre and postoperative pelvic canal ratio ($P > 0.05$). However, a statistically significant difference was found between the pre- and post-operative hemipelvic canal ratio ($P < 0.05$) (Table 5).

However, when evaluating the radiographic measurements of pre and postoperative pelvic canal ratio, hemipelvic canal ratio and inter-ilium distance, a return to normal anatomical structure between the right and left ilium was observed in all cases before and after surgery, although no

statistically significant difference was found ($P > 0.05$). No statistically significant difference was found in the pelvic canal ratio before and after surgery ($P > 0.05$). However, a statistically significant difference was observed in the hemipelvic canal ratio before and after surgery ($P < 0.05$). In addition, postoperative radiological follow-up of sacroiliac dislocation cases showed good anatomical alignment. Although there was no statistical change between the pre- and post-operative inter-ilium ratios, a reduction in the post-operative average was observed. The pelvic canal ratio (distance from the sacrum to the ilium) was 1.06 cm preoperatively and 1.16 cm postoperatively, showing no statistical difference but a recorded increase. A statistically significant difference was found in the acetabulum/midline ratio pre- and post-operatively ($P < 0.01$).

Table 3. The preoperative pelvic canal ratio, hemipelvic canal ratio, and distance between iliums of the cases are presented

Case No	Distance between iliums (R\L)	Pelvic canal ratio	Hemipelvic canal ratio (R\L)
1	0.84\0.42= 2	1.69\1.26= 1.56	0.88\0.81= 1.08
2	1.23\1.23= 1	2.23\2.46= 0.91	1.48\0.75= 1.97
3	0.93\0.58= 1.6	1.95\1.51= 1.3	1.07\0.88= 1.2
4	1.39\0.96= 1.45	2.69\2.35= 1.14	1.64\1.05= 1.56
5	0.64\0.86= 0.74	1.12\1.5= 0.75	0.88\0.24= 3.7
6	1.48\1.14= 1.3	2.95\2.62= 1.13	1.95\1.00= 1.95
7	0.84\0.47= 1.8	1.46\1.31= 1.11	0.79\0.67= 1.18
8	1.03\0.56= 1.8	1.54\1.59= 0.97	0.91\0.63= 1.4
9	1.07\0.91= 1.18	2.05\1.98= 1.04	1.16\0.89= 1.3
10	0.66\0.48= 1.38	1.13\1.14= 0.99	0.68\0.45= 1.5
11	0.81\0.74= 1.09	1.78\1.55= 1.15	0.77\1.01= 0.76
12	0.63\0.70= 0.9	1.58\1.33= 1.19	0.74\0.84= 0.88
13	0.96\0.89=1.08	1.5\1.85= 0.81	1.09\0.41= 2.66
14	0.96\1.23= 0.8	2.53\2.19= 1.16	1.07\1.46= 0.73
15	0.82\0.64= 1.3	1.6\1.46= 1.10	0.73\0.87= 0.84
16	1.23\1.17= 1.05	1.98\2.4= 0.83	1.44\0.54= 2.7
17	0.93\0.84= 1.1	1.55\1.77= 0.88	1.09\0.46= 2.37
18	1.12\1.91= 0.59	3.17\3.03= 1.05	1.19\1.98= 0.6
Mean	1.231 ± 0.387	1.059 ± 0.194	1.577 ± 0.836

Table 4. The postoperative pelvic canal ratio, hemipelvic canal ratio and distance between iliums of the cases are presented

Case No	Distance between iliums (R\L)	Pelvic canal ratio	Hemipelvic canal ratio (R\L)
1	0.79\0.74= 1.07	1.77\1.53= 1.16	0.96\0.81= 1.19
2	0.74\0.57= 1.30	1.71\1.31= 1.30	1.00\0.71= 1.40
3	0.90\0.49= 1.83	1.85\1.39= 1.33	1.02\0.83= 1.23
4	1.40\1.35= 1.04	2.91\2.75= 1.06	1.19\1.72= 0.70
5	0.88\0.84= 1.05	2.08\1.72= 1.21	1.02\1.06= 0.96
6	0.67\0.72= 0.93	1.36\1.39= 0.98	0.48\0.88= 0.55
7	0.76\0.68= 1.12	1.14\1.44= 0.80	0.40\0.74= 0.54
8	0.61\0.61= 1	1.54\1.22= 1.26	0.72\0.82= 0.88
9	1.16\1.09= 1.06	2.53\2.25= 1.12	1.35\1.18= 1.14
10	0.67\0.67= 1	1.3\1.34= 0.97	0.59\0.71= 0.83
11	1.39\1.53= 0.9	3.57\2.92= 1.22	1.77\1.80= 0.98
12	0.91\0.91= 1	1.98\1.82= 1.09	0.91\1.07= 0.85
13	0.79\0.85= 0.93	2.08\1.64= 1.27	1.04\1.04= 1
14	1.12\1.37= 0.82	3.12\2.49= 1.25	1.58\1.54= 1.03
15	1.02\1.00= 1.02	2.24\2.02= 1.11	1.29\0.95= 1.36
16	0.76\0.61= 1.25	1.8\1.37= 1.31	0.89\0.91= 0.98
17	1.38\1.51= 0.91	3.3\2.89= 1.14	1.52\1.78= 0.85
18	1.16\1.24= 0.94	3.21\2.4= 1.34	1.54\1.67= 0.92
Mean	1.065 ± 0.224	1.162 ± 0.145	0.966 ± 0.240

Table 5. A comparison of the ratio between the two iliums. The ratio between the sacrum and ilium and the ratio between the acetabulum and the midline before and after surgery is presented

	Preoperative			Postoperative		
	n	Average	Std. Deviation	Average	Std. Deviation	p-value
Distance between iliums	18	1.23	0.387	1.07	0.224	0.085
Pelvic canal ratio (ratio between the sacrum and ilium)	18	1.06	0.194	1.16	0.145	0.114
Hemipelvic canal ratio (ratio between the acetabulum and the midline)	18	1.58	0.836	0.97	0.240	0.010*

* P<0.05. Paired samples t-test

Postoperative Surgical Findings

The lateral surface of the ilium body was identified along with the points of the cranial and caudal dorsal iliac spine. The caudal 1/3 of this region was considered and its junction with the ventral iliac spine was calculated. In cases where the screws were misplaced, the screw placement was re-evaluated. A dorsal approach to the body of ilium exposed the dorsal and midline of L7, the sacrum and its dislocations. As the fibrous cartilaginous articular surfaces between the articular joint and the sacrum were exposed and visible, screw placement was more precise. In all 18 cases, the clinical course remained with no complications.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In cats with sacroiliac luxation, even in cases where surgery may be beneficial, clinicians tend to favour conservative management. This is based on the belief that cats have a better prognosis for recovery from such injuries than dogs (26,27). Surgical procedures are potentially difficult due to the anatomical structure of the feline sacrum. In previous years, conservative management was generally considered the preferred and sufficient option for pelvic fractures in cats (11,14,27). The belief that cats can successfully cope with such injuries and that the traditional repair method of sacroiliac dislocation is technically challenging and risky has influenced this decision (27). In a retrospective study, Bennett (14) reported good functional outcomes in most cases after conservative treatment, with no significant lameness observed at four weeks. However, complications of conservative management included dislocation of pelvic fragments, pelvic canal stenosis and constipation or obstipation (16). However, according to Langley-Hobbs (17), although the prognosis appears good after conservative treatment in cats, ankylosis of one or both sacroiliac joints and degenerative changes in the lumbosacral joint often develop. This is thought to be due to altered force transmission and compensatory overload (26). Surgical stabilisation of sacroiliac luxations is advocated as it provides early pain relief and improves patient comfort (23,28). As 58.6% of cats with pelvic fractures also have concomitant musculoskeletal injuries, these factors are particularly important (26). Long-term studies evaluating the quality of life in cats with sacroiliac luxation treated conservatively and surgically are lacking (11). In addition, although few cats present with lameness after conservative treatment, a large number develop degenerative osteoarthritis in the affected sacroiliac joint, contralateral sacroiliac joint and lumbosacral joint due to altered force transmission and compensation (26). Surgical fixation of sacroiliac dislocations restores normal pelvic anatomy and establishes a strong connection between the appendicular and axial skeleton, ensuring normal alignment of force transmission and facilitating early pain-free walking (29,30).

In this study, surgery was preferred for sacroiliac dislocation. Surgical repair of sacroiliac dislocation has advantages, including early pain relief, less narrowing of the pelvic canal, relief of compression of organs passing through the pelvic canal, and reduction of pressure on the sciatic nerve. Nerve damage has been reported to heal in 81% of patients with pelvic fractures and sacroiliac dislocations (11). Rare postoperative complications include repair failure,

nerve damage, bladder control problems and fecal incontinence (29). In this study, one of the approaches used to expose the sacroiliac joint was a dorsal and lateral approach to the ilium. A small Hohmann retractor was used to lift down the ilium wing ventrally, exposing the articular surface of the sacral wing. The iliac-directed drill was aimed to reach the articular surface of the sacrum for screw stabilization. The screws used were positioned to cover approximately 60% of the space between the two ilia. After application, radiographs were taken before closing the surgical site and the screws were checked for proper placement. If the screws did not exert pressure on the anatomical region, a second screw was used for stabilisation. Screws that were not in the desired plane were removed and repositioned. In cases where a lateral iliac approach was used, although the anatomical region of the ilium was correctly identified, there was a higher chance of missing the articular surface of the sacrum body due to the risk of displacement from trauma. Similar results have been reported in previous studies (8,9).

When drilling the ilium in cats, it has been shown that the drill point is not a useful indicator for determining the location of the screw hole in the sacral wing. Correct placement of the drill hole at the first attempt is critical because the space available for correct screw placement is much smaller than the implant itself. The average size of this area is less than 0.5 cm², which is approximately 25% of the articular surface of the sacral wing. Any further intervention reduces the chances of obtaining a solid drill hole with good bone purchase for the screw. To reduce the risk of incorrect screw placement, a pilot hole was first made with a small diameter Kirschner wire (2,28,31,32). As postoperative radiographs were taken, faulty implants were corrected. In previous studies, screw placement was considered excellent if at least 60% of the sacral application was achieved, protecting the vertebral canal (8,9). The low rate of vertebral canal penetration observed in this study may be explained by the accurate calculation of the anatomical region of the ilium and the use of small diameter screws, which reduced the risk of vertebral canal penetration in the small safe area.

As there was no non-surgical group in this study, it is difficult to objectively state that surgical repair of sacroiliac dislocation results in faster recovery compared to conservative approaches in cats. However, studies have reported that minimally displaced sacroiliac dislocations can be managed conservatively with good results (30). In cases of sacroiliac dislocation, surgical stabilization should be performed if there is moderate to severe displacement of the pelvis from the sacrum, if both the left and right sacroiliac joints are luxated, or if there are symptoms suggestive of sciatic nerve involvement. If the function of the sciatic nerve is compromised, surgery should be performed as soon as possible to reduce pressure on the nerve, which will help prevent permanent damage (33). In the cases in this study, preoperative neurological examination revealed a decrease in sciatic nerve reflexes. However, postoperative reflexes returned and normal leg function was observed. Restoration of neurological signs is considered to be the most reliable prognostic indicator in cats with sacrococcygeal dislocation, and normalisation of urinary function is a sign that the process is progressing positively. Previous studies support these findings (29). Furthermore, the results of single and double

screw stabilisation were found to be consistent with recent studies (34,35).

Postoperative clinical evaluations indicated a favorable recovery in all cases, with no signs of neurological issues or problems related to defecation or urination. Radiographic assessments revealed that the anatomical alignment between the right and left ilium improved after surgery. While some measurements showed no statistically significant changes, there was a noticeable improvement in overall pelvic alignment. Radiological follow-ups confirmed proper anatomical positioning, and certain parameters demonstrated meaningful differences after surgery, suggesting that screw fixation contributed to restoring a more normal pelvic structure. The absence of constipation was considered an important clinical outcome. In addition, the pelvic canal diameter ratio provides an indication that pelvic canal width has been restored after pelvic injury repair (36). It has been reported that the normal pelvic canal diameter ratio in dogs and cats is ≥ 1.1 (37). In the cases in this study, 84% had a pelvic canal diameter greater than 1.1, while the remaining 16% were close to this value. The pre- and post-operative rates of pelvic canal narrowing were closely related to the surgical procedure performed.

In conclusion, it is believed that surgical fixation in cats with sacroiliac luxations will restore normal pelvic anatomy and the strong connection between the appendicular and axial skeleton, thus ensuring normal alignment of force transmission and facilitating early pain-free walking. Neurological problems will be alleviated and the urinary and excretory systems will function normally. Although positive developments were observed in the pre and post-operative results of inter-ilium distance, pelvic canal ratio and hemipelvic canal ratio, no statistical differences were found in some parameters. This suggests that an increase in the number of cases should be considered. In the chosen surgical technique, the dorsal exposure of the iliac body allows for easier identification of the articular joint and the fibrous cartilaginous articular surfaces of the sacrum, thus facilitating the procedure. Additionally, It was also recommended that non-surgical groups be included in the evaluation to increase the power of the study.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Furkan Beşoluk for sharing his valuable views and expertise in the field of statistics with us and for supporting us throughout our study.

FINANCIAL SUPPORT

In the conduct of this research no support was received from any organization.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to report.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

In this study, the research design and study planning were determined by MA and NZE. Data collection were conducted by IS, HES, ZC.

ETHICAL STATEMENT

An approval report for the proposed project was obtained from the Ethical Committee for Laboratory Animal Production and Research Centre of Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine (SÜVDAMEK), and the study was started according to the approval report (dated 30.01.2025, meeting number 2025/2, decision number 2025/18). Informed consent forms were obtained from all animal owners before the animals were enrolled in the study.

REFERENCES

1. **Bookbinder PE, Flanders JA (1992).** Characteristics of pelvic fracture in the cat: A 10-year retrospective study. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 5(3):122-127.
2. **Burger M, Forterre F, Brunnberg L (2004).** Surgical anatomy of the feline sacroiliac joint for lag screw fixation of sacroiliac fracture-luxation. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 17:146-151.
3. **Meeson RL, Geddes AT (2017).** Management and long-term outcome of pelvic fractures: A retrospective study of 43 cats. *J Feline Med Surg.*, 19:36-41.
4. **DeCamp CE, Johnston SA, Dejardin LM (2016).** Brinker. Piermattei and Flo's handbook for small animal orthopaedics and fracture repair. In: Feline sacroiliac joint for lag screw fixation of sacroiliac fracture-luxation. DeCamp CE. Johnston SA (eds). 5th ed. Saunders Elsevier. Missouri. USA., 146-155.
5. **Anderson A, Coughlan AR (1997).** Sacral fractures in dogs and cats: A classification scheme and review of 51 cases. *J Small Anim Pract.*, 38:404-409.
6. **Hulse DA, Shires P, Waldron D (1985).** Sacroiliac luxations. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, 7:493-499.
7. **Grierson J (2019).** Dealing with pelvic fractures in cats. *In practice Companion Anim Pract.*, 41(3):106-114.
8. **Zamirbekova N, Uzunlu EO, Özdiil B, Arıcan M (2021).** Kedi-lerde corpus ossis ilium kırıklarının sağaltımında kemik plakların os ilium'un lateral ve dorsal yüzüne uygulamasının klinik ve radyolojik olarak karşılaştırılması. *Eurasian J Vet Sci.*, 37(1):32-40.
9. **Arıcan M (2024).** Anatomik bölgelere cerrahi yaklaşımlar. (İçinde): Kedi ve köpek Ortopedi ve Travmatoloji. 2.Baskı. Anka Promosyon Matbaa Mlz. Ltd. Şti., Konya., 131-174.
10. **Messmer M, Montavon PM (2004).** Pelvic fractures in the dog and cat: A classification system and review of 556 cases. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 17:167-83.
11. **Meeson R, Corr S (2011).** Management of pelvic trauma. Neurological damage. urinary tract disruption and pelvic fractures. *J Feline Med Surg.*, 13:347-61.
12. **Averill SM, Johnson AL, Schaeffer DJ (1997).** Risk factors associated with development of pelvic canal stenosis secondary to sacroiliac separation: 84 cases (1985-1995). *J Am Vet Med Assoc.*, 211:75-78.
13. **Voss K, Langley-Hobbs SJ, Borer L (2009).** Pelvis. In: Feline orthopaedic surgery and musculoskeletal disease. Montavon PM. Voss K. Langley-Hobbs SJ (eds). 1th ed. Elsevier Saunders. Edinburgh., 423-430.
14. **Bennett D (1975).** Orthopaedic disease affecting the pelvic region of the cat. *J Small Anim Pract.*, 16:723-738.
15. **Lanz OI (2002).** Lumbo sacral and pelvic injuries. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 32(4):949-62.
16. **Schrader SC (1992).** Pelvic osteotomy as a treatment for obstruction in cats with acquired stenosis of the pelvic canal: six cases (1978-1989). *J Am Vet Med Assoc.*, 200:208-13.

17. **Langley-Hobbs SJ (2010).** Sacroiliac luxation in cats. Proceedings of the ACVS veterinary symposium; 2010 Oct 18-23; Seattle. WA. Washington. DC: American College of Veterinary Surgeons, 326-329.
18. **Moens NMM DeCamp CE (2018).** Fractures of the pelvis. In: Veterinary Surgery: Small Animal. Johnston SA. Tobias KM (eds). 2nd ed. Elsevier. St Louis., 938-56.
19. **Stecyk CN, Jones SC, Hostnik ET, Tinga S, Kieves NR (2021).** Conservative management of sacroiliac luxation in 17 dogs: radiographic changes and long-term owner follow-up. *Can Vet J.*, 62(03):261-265.
20. **Yap FW, Dunn AL, Farrell M (2014).** Trans-iliac pin/bolt/screw internal fixation for sacroiliac luxation or separation in cats: six cases. *J Feline Med Surg.*, 16:354-362.
21. **Pratesi A, Grierson JM, Moores AP (2018).** Single transsacral screw and nut stabilization of bilateral sacroiliac luxation in 20 cats. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 31:44-52.
22. **Yap FW, Dunn AL, Garcia-Fernandez PM (2015).** Femoral head and neck excision in cats: medium to long-term functional outcome in 18 cats. *J Feline Med Surg.*, 17: 704-710.
23. **Fisher CJ, Cavanagh AA, Liss D, Adams T, Marvel SJ, Hall KE (2023).** Surgical interventions and outcome in a population of feline trauma patients. *J Vet Emerg Crit Care.*, 33(3):337-347.
24. **Montavon PM, Boudrieau RJ, Hohn RB (1985).** Ventrolateral approach for repair of sacroiliac fracture-dislocation in the dog and cat. *J Am Vet Med Assoc.*, 186:1198-2001.
25. **Tomlinson J (2020).** Minimally Invasive Repair of Sacroiliac Luxation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 50(1):231-239.
26. **Boehmer E (1985).** Beckenfrakturen und -luxationen bei der Katze in den Jahren 1975-1982. *Vet Med Dissertation.*, 151.
27. **Raffan PJ, Joly CL, Timm PG (2002).** A tension band technique for stabilisation of sacroiliac separations in cats. *J Small Anim Pract.*, 43:255-260.
28. **Tomlinson J (2012).** Minimally invasive repair of sacroiliac luxation in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 42:1069-1077.
29. **Couper E, De Decker S (2020).** Evaluation of prognostic factors for return of urinary and defecatory function in cats with sacrocaudal luxation. *J Feline Med Surg.*, 22(10):928-934.
30. **Bird FG, Vicente F (2020).** Conservative management of sacroiliac luxation fracture in cats: medium- to long-term functional outcome. *J Feline Med Surg.*, 22(6):575-581.
31. **Philp H, Durand A, De Vicente F (2018).** Use of computed tomography to define a sacral safe corridor for placement of 2.7 mm cortical screws in feline sacroiliac luxation. *J Feline Med Surg.*, 20(6):487-493.
32. **Hanlon J, Hudson CC, Litsky AS, Jones SC (2022).** Mechanical evaluation of canine sacroiliac joint stabilization using two short screws. *Vet Surg.*, 51(7):1061-1069.
33. **Çatalkaya E, Yayla S, Altan S, Ersöz Kanay B, Saylak N, Hatipoğlu Ş (2024).** A Retrospective Study on Pelvic Fractures in Cats and Dogs (2020-2022). *Kocatepe Vet J.*, 17(1):15-21.
34. **Tomlinson JL (2003).** Fractures of the pelvis, in: Textbook of Small Animal Surgery. Slatter D (ed). 3rd ed. Saunders. Philadelphia. PA., 1189-2001.
35. **Schreiber KRL, Thibault A, Hamon M, Haudiquet P (2024).** Stabilization of 82 sacroiliac luxations in 67 cats using two sacroiliac screws (2014-2023). *Vet Surg.*, 53(8):1366-76.
36. **Kudnig ST, Fitch RB (2004).** Trans-iliac and transsacral brace fixation of sacral fractures and sacroiliac luxations seven cases. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 17:210.
37. **Leasure CS, Lewis DD, Sereda CW (2007).** Limited open reduction and stabilization of sacroiliac fracture-luxations using fluoroscopically assisted placement of a trans-iliosacral rod in five dogs. *Vet J.*, 36:633-643.

Sığırlarda *In Vitro* Kültürü Etkileyen Çevresel Faktörler

Ayşe SAPCI^{1,a}, Yunus Emre DENİZ^{1,b}, Fatma SATILMIŞ^{1,c,✉}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

ORCID: ^a0009-0009-6739-4466, ^b0009-0005-9847-3061, ^c0000-0002-9877-8405

✉ Sorumlu Yazar

Fatma SATILMIŞ
Selçuk Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

fatmasatilmis@selcuk.edu.tr

Received
01.11.2024

Accepted
06.03.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1577834

How to cite: Sapcı A, Deniz YE, Satılmış F (2025). Sığırlarda *In Vitro* Kültürü Etkileyen Çevresel Faktörler. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):71-78.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Öz

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sığır embriyolarının *in vitro* üretimi önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalar, *in vitro* üretimde embriyoların birçok mikro ortama uyum sağlaması gerektiği için sonuçların *in vivo* embriyo üretim başarısına göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca *in vitro* embriyo üretiminde bulunulan sıvıların taklit edilmesi ve ortamların stabilizasyonunda da ciddi problemler yaşanmaktadır. Bu nedenle embriyoların üretilmesi sırasında laboratuvar ortamının stabilizasyonunu sağlamak ve başarıyı artırmak için, *in vitro* kültür ortamını etkileyen çevresel faktörlerin (ısı, ışık, osmolarite, nem, inkübatör, uçucu organikler, gaz fazı, kültür ortamı, yağ kaplaması, tercih edilen plastik materyaller vb) etkisi unutulmamalıdır. Sunulan bu derlemede, *in vitro* embriyo üretiminin en önemli basamaklarından biri olan *in vitro* kültür aşamasını etkileyen çevresel faktörlerin öneminin açıklanması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çevresel faktörler, embriyo, *in vitro* kültür, sığır

Environmental Factors Influencing *In Vitro* Culture in Cattle

Abstract

In vitro production of bovine embryos has improved significantly in recent years. However, studies show that *in vitro* embryo production is less successful than *in vivo* embryo production. However, studies have shown that *in vitro* production results are lower than *in vivo* embryo production success because embryos need to adapt to many microenvironments. Also, in *in vitro* embryo production, there are serious problems in mimicking the fluids and stabilizing the environments. Therefore, the influence of environmental factors affecting the *in vitro* culture environment (temperature, light, osmolarity, humidity, incubator, volatile organic compounds, gas phase, culture medium, oil coating, preferred plastic materials, etc.) should not be forgotten to stabilize the laboratory environment and increase the success of embryo production. In this review, it is aimed to explain the importance of environmental factors affecting the *in vitro* culture stage, which is one of the most important steps of *in vitro* embryo production.

Key Words: Cattle, embryo, environmental factors, *in vitro* culture

GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde, hayvansal kaynaklı ürünlere talep giderek artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, tüketilen hayvansal protein miktarı, ülkemizde tüketilen miktarın yaklaşık iki katıdır. Türkiye, hayvansal kaynaklı protein ihtiyacını karşılamak için hayvancılık alanında yapılan biyoteknolojik çalışmalara ve ithalata açık hale gelmiştir. Ülkemizde ve tüm dünyada, artan talebi karşılamak ve hayvan ıslahı amacıyla yapılan biyoteknolojik uygulamalar arasında klonlama, senkronizasyon, suni tohumlama ve embriyo transferi (ET) gibi çalışmalar yer almaktadır (1,2). Hayvancılığın gelişmesi açısından 1970'li yıllarda başlayan ET çalışmaları, günümüzde yaygın olarak uygulanmaktadır. Hayvancılık ekonomisinin gelişmiş olduğu ülkelerde, ET uygulaması ile yıllık 1,5 milyon civarında embriyo üretimi yapılmaktadır (3). Türkiye'de ise 1980'li yıllarda başlanan ET uygulamalarında; gerekli alt yapı ve personelin bulunmaması, hayvan kayıtlarının sistemli olmaması, genetik değerlerin bilinmemesi, elde edilen gebelik oranlarının farklılığı ve maliyetin yüksek olması nedeniyle saha şartlarında önemli bir başarı elde edilememiştir (4-6).

Sığırlarda biyoteknolojik bir yöntem olan ET *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda sığırlarda *in vitro* embriyo üretimine (IVEP) karşı ilginin arttığı bilinmektedir (7). Ancak laboratuvarında yapılan birçok çalışmanın sonucunda IVEP oranının %20 ile %40 arasında olduğu bildirilmektedir. Dünya çapında IVEP, sığırlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Uluslararası Embriyo Teknolojileri Topluluğuna (IETS) göre 2019 yılında sığırlarda üretilen toplam embriyonun yaklaşık %70'inin *in vitro* yöntemle elde edildiği rapor edilmiştir (8). *In vitro* embriyo üretimi; ovaryumlardan oosit eldesi, *in vitro* matursayon (IVM), spermanın fertilizasyon için hazırlanması, *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültür (IVC) adımlarından oluşmaktadır (9,10).

In vitro kültür, fertilizasyonun ardından oluşan embriyoların morula-blastosist aşamasına kadar gelişmesinin sağlandığı ortamdır (11). Son yıllarda hazır ticari kültür medyumları ve yöntemleri daha çok tercih edilmesine rağmen, konvansiyonel embriyo kültür sistemleri ilk olarak John Biggers tarafından kullanılmıştır. Kültür ortamlarında ilk olarak somatik hücre kökenli Ringer ve Tyrode türevleri basit tuz çözeltileri ve Ham's F10 gibi medyumlar kullanılmıştır. Kullanılan bu kültür medyumlarının embriyo gelişim oranları ve hızları sınırlı kalmıştır (12). *In vitro* kültür, IVF sonrası embriyoların kalitesi ve blastosist gelişimlerinde önemli bir rol oynamaktadır (13,14). Günümüzde IVC'de blastosist aşamasına ulaşan muhtemel zigotların oranı %20 ile 40 arasında değişmektedir (8,15). Bu nedenle IVC'de kullanılan medyumların kimyasal yapısı ve içeriğindeki bileşenler (protein, serum, serum albumini, aminoasitler, büyüme faktörleri, somatik hücrelerden hazırlanmış kokültür katkı maddeleri, vitaminler, antibiyotikler ve antioksidanlar vs.), bazı kimyasal ve çevresel faktörler *in vivo* embriyo üretiminde optimum şartları sağlamak amacıyla oldukça önem arz etmektedir (16,17).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

In vitro kültürde kullanılan katkı maddelerinin *in vitro* embriyo gelişiminde farklılıklar oluşturduğu bildirilmektedir. *In vitro* kültürde embriyonik gelişimi ve kalite artışını sağlamak amacıyla çevresel ve biyokimyasal parametreler optimum

seviyede tutulmalıdır (10). *In vitro* kültürü etkileyen biyokimyasal parametreler; serum kalitesi, protein ve makro moleküller, enerji kaynakları ve antioksidan maddelerdir. *In vitro* kültürü etkileyen çevresel parametrelerde ise; sıcaklık, pH, ışık, ozmolarite, nem, inkübatör, kullanılan petri kapları, uçucu organikler, personel ve gazlar yer almaktadır (18).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN BİYOKİMYASAL FAKTÖRLER

Kültürde, serumun kalitesine ve elde edilme zamanına göre; fetal buzağı serumu (FCS), yeni doğan buzağı serumu (NCS), östrustaki inek serumu (ECS) gibi farklı serumlar kullanılmaktadır. Serumun hangi yaştaki hayvandan elde edildiği önemlidir. Yeni doğan buzağı serumu ile yetişkin sığır serumları karşılaştırıldığında, NCS'nin IVC'de morula-blastosist elde etme oranının ECS'e göre daha üstün olduğu belirtilmektedir (19). Ayrıca yetişkin sığır serumunda protein oranı %85 iken immünoglobulin konsantrasyonu FCS'de daha fazladır (20). *In vitro* kültürde nadir olarak at ve domuz gibi hayvan türlerinden elde edilen serumlar da kullanılmaktadır. *In vitro* kültürde en yaygın kullan serum ise FCS'dir (21). *In vitro* kültürde maternal ve fetal serum bileşikleri protein ve makro molekül kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kültür vasatına eklenen FCS morula ve blastosist aşamasında indükleyici etkiye sahiptir (22,23). Kültür vasatlarında protein ilavesi olarak FCS ve inek serum albumini (BSA) enerji kaynağı olarak da eklenmektedir. Yapılan çalışmalar; kültürün 7. gününde FCS, BSA ve insülin ilavesinin geç morula/erken blastosist oranını artırdığını bildirilmektedir (24,25). *In vitro* embriyo kültüründe makro moleküllerin varlığı, gamet ve embriyoların manipülasyonunu kolaylaştırmaktadır (26). Bununla birlikte, embriyonun preimplantasyon döneminde kan proteinlerinin kullanımı, kontaminasyon ve enfeksiyon risklerini artırdığı bildirilmektedir (27).

Embriyonik gelişimin düzenlenmesinde en önemli protein kaynağı aminoasitlerdir. Ovidukt sıvısında en çok bulunan protein IgG'dir (immünglobülin G). Erken embriyonik dönemde plasenta oluşumuna katılan trofoblast hücreleri, nonesansiyel aminoasitleri ve glutamini kullanır. Preimplantasyon dönemde (8 hücreli) esansiyel aminoasitlerin kullanılması fetal gelişim olasılığını artırmaktadır (28). Aminoasitler, IVF sonrası sığır embriyolarının gelişimini etkiler ve blastosist aşamasında toplam hücre sayısını artırır (29). *In vitro* kültürde protein kaynağı olarak kullanılan BSA'nın birçok faydası bulunmaktadır. İnek serum albumin, embriyoyu ağır metaller gibi toksik maddelerde karşı korumaktadır. Ayrıca BSA, büyüme faktörleri gibi bazı hormonları içerir. Bunun yanında BSA vasatın yüzey gerilimini azaltarak embriyoların pipet, tüp veya petriye yapışmasını engellemektedir. Embriyonik gelişim amacıyla sıklıkla kullanılan BSA'nın avantajları yanında önemli dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan bazıları mitokondrial bozukluklar, fazla miktarda laktat üretimi, hücre içi kütlede istenmeyen oluşumlar, apoptotik hücrelerde artıştır. Ayrıca protein sentezinde, hücre bağlantı sayılarında, trofoblast hücreleri ve iç hücre kitlesi (ICM) oranında azalmalar görüldüğü belirtilmektedir (30). Somatik hücreler IVEP'de varyasyon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, IVC'de kullanılan somatik hücreler, inek viral diyaresi-mukozal hastalığı (BVD-MD) gibi viral kontaminasyona karşı da hassastır. Sığır Herpes Virüs-1 (BHV-1)

embriyonik hücrelerde viral replikasyon yapmasa bile embriyo gelişimini ve *in vitro* kültür ortamlarını etkileyebilmektedir (31,32).

In vitro embriyo kültüründe kullanılan enerji kaynakları genellikle laktat, piruvat ve glikozdur. Zigot, erken embriyonik dönemde birincil enerji kaynağı olarak piruvatı tercih ederken, sekiz hücreli aşamada glikoz kullanılmaktadır (33). Pentoz fosfat yolu (PPP) tarafından metabolize edilen glikoz, nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz parçalarını üretir. Erken embriyonik dönemde glikoz kullanılmamasının nedeni fosfofruktokinaz (PFK-1) enzim aktivitesinin olmamasıdır. Ayrıca fetal serumdaki glikoz konsantrasyonunun erişkin bir sığırdan 6 kat fazla olduğu bilinmektedir. Koyun ve sığırların aksine, özellikle erken embriyonik dönemde (4. güne kadar) manda embriyolarının *in vitro* kültürü için glikoz varlığının gerekli olduğu ortaya konmuştur (34).

In vivo şartlarda embriyonun kendisinde ve uterusu bulunan antioksidan sistemler embriyoyu koruma altına alınmaktadır. Bu antioksidan sistemler, glutatyon, taurine, hipotaurin, askorbat, piruvat, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), E ve C vitaminleridir (35). Fakat *in vitro* şartlarda gelişen embriyolar kendi içerdiği antioksidan sistemleri dışında oksidatif strese karşı koruyucu başka bir mekanizmaya sahip olmadıkları için, *in vitro* embriyo üretiminde oksidatif stresin kontrol ve koruma altına alınması gerekmektedir. Bu amaçla IVEP aşamalarında (IVM, IVF) özellikle de *in vitro* kültür medyumlarına, antioksidan enzimler (SOD, CAT vb.), metal şelatörler (EDTA vb.), tiol bileşikler (glutatyon, sisteamin vb.), proteinler ve vitaminler eklenmektedir (36). Glutatyon (GSH) ve sistein hücre içi fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi) korunmasında ve reaktif türlerin zararlı etkilerine karşı önemli etkinliğe sahiptir (37). Embriyo gelişiminin ilk fazında istenilen etkinin sağlanması için olgunlaşma ortamına antioksidan maddelerin eklenmesinin kritik bir nokta olduğu bilinmektedir (38). Sentetik ovidukt sıvısı (SOF) ilave edilen dithioerythritolün (DTE) (50 µM) bölünmüş embriyo oranına önemli katkı sağladığı bildirilmektedir (39). Glutatyon domuz, hamster, koyun, sığır ve fare dahil olmak üzere çeşitli türlerde oosit olgunlaşması sırasında sentezlenir. Glutatyon sentezi, sisteinin varlığına bağlıdır ve hücre içi sistein seviyeleri hız sınırlayıcı bir faktör olarak embriyo gelişimini etkileyebilir (40,41). Yapılan bazı çalışmalar mandaların oosit olgunlaşması sırasında ortama sisteamin eklenmesi ile sitoplazmik glutatyon içeriğinin ve bunu takiben embriyo gelişiminin arttırdığını bildirilmiştir (41). Fare embriyolarında yapılan IVC sırasında C ve E vitaminlerinin ortama eklenmesinin oksidatif hasarı azalttığı ve blastosist gelişim oranlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (42). Antioksidan olarak C ve E vitaminlerinin kombinasyonu, lipid peroksidasyonunun önlenmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle farklı kültür medyumlarına katılan antioksidanlar ile ilgili başka çalışmaların yapılması gerektiği ve kültür ortamlarında etkili antioksidanların ve dozlarının saptanmasıyla kültür medyumlarının iyileştirilebileceği bildirilmektedir (30).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sığır embriyolarının *in vitro* üretimi önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda hala IVEP başarısı *in vivo* üretilen embriyolardan daha düşüktür. Çünkü *in vitro* üretimde embriyoların birçok mikro

ortama uyum sağlaması gerekir. Fakat *in vitro* embriyo üretiminde bulunan sıvıların taklit edilmesi ve ortamların stabilizasyonunda hala sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle, embriyoların üretilmesi sırasında ortam stabilizasyonu büyük önem arz etmektedir (43). Sığır embriyolarının üretiminde IVC en son adımı oluşturmaktadır. *In vitro* kültür muhtemel zigot oluşumunu takiben yaklaşık 6-9 günlük kültür süresini içermektedir. Sığır embriyolarında en yaygın kullanılan vasatları SOF'lar oluşturmaktadır. Sentetik ovidukt sıvıları IVEP sisteminin temel yapı taşlarını oluşturmaktadır. Kültür süresince embriyolar tek bir vasat sistemi veya vasat formülasyonu kombinasyonlarının oluşturulması ve değiştirilmesi ile oluşturulan sıralı sistemlerde geliştirilebilmektedir. Oluşturulan sıralı sistemler embriyonun oviduktan uterusu doğru ilerlemesi sırasında bulunduğu fizyolojik ortamların taklit edilmesi ile oluşturmaktadır. Ancak, oluşturulan tüm vasatların başarısı bazı çevresel faktörler nedeniyle laboratuvar ortamından laboratuvara bile değişkenlik gösterebilmektedir (44,45). *In vitro* kültür koşulları son yıllarda, esas olarak ortam formülasyonlarının ayarlanmasıyla geliştirilmiştir. Bununla birlikte, çoğu kültür sisteminde %30'un üzerinde blastosist oluşumu sağlanabildiği, ancak her zaman aynı başarıya ulaşamadığı bildirilmektedir. Bu durumun en önemli nedenleri arasında; serum takviyesinin embriyo/fetal gelişim için zararlı olması, anormal derecede embriyonik ve fetal büyüme şekillenmesi ve değişmiş gen modelleri yer almaktadır. Bununla birlikte, farklı embriyo kültürü ortamlarının ve yöntemlerinin varlığı, embriyo kültür ortamının en uygun bileşenlerini tanımlamayı çok zor hale getirmektedir (46,47).

In vitro embriyo üretiminde başarıyı IVC'deki iyileştirmeler haricinde tüm IVEP sisteminin başarısı ayrı ayrı etkilenmektedir. Ayrıca, kültür ortamı birçok çevresel faktörden etkilenmektedir. Bu çevresel faktörler arasında; laboratuvar ortamı (ısı, ışık, osmolarite, nem), inkübasyon koşulları ve inkübatör etkenleri, uçucu organikler, gaz fazı, kültür ortamı, yağ kaplaması, tercih edilen plastik materyaller ve sterilizasyon şekilleri ve embriyo yoğunluğu yer almaktadır. Ayrıca, bunlara ek olarak IVEP adımlarının tüm sürecine dahil olan personelin becerisi de başarıyı etkileyebilmektedir (48-50).

Mineral Yağlar

In vitro kültür sistemlerinde yağ kaplaması, ortam osmolaritesinde ve sıcaklıkta dalgalanmalara neden olabilecek buharlaşmaları önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kullanılan mineral yağların lipofilik toksik maddelerin birikimini azalttığı da bildirilmektedir. Günümüzde genellikle tercih edilen nemlendirme sistemi mevcut olmayan tezgâh üstü inkübatörler için, mineral yağ kullanımı gereklidir. Ancak, nemlendirme sistemi mevcut ve yeterli hacimde kültür medyumunu kullanan sistemler var ise açık kültür veya yağ kaplaması olmayan kültür teknikleri kullanılabilir. *In vitro* kültür, *in vitro* embriyo üretiminin en uzun adımı olması nedeniyle bu süreçte kullanılan mineral yağlar büyük önem arz etmektedir (51). *In vitro* kültür sistemlerinde tercih edilen mineral yağların avantajlarına rağmen sığır, domuz, insan, koyun ve farede yapılan çalışmalarda, embriyo gelişiminde olumsuz etkilerinin de olabileceği bildirilmiştir. Mineral yağların en büyük olumsuzluğunun çözünabilir maddeleri emme potansiyellerinden kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Özellikle mineral yağlar kültür ortamındaki steroid hormonları (östrojen

ve progesteron) absorbe ederek ortamdaki biyoyararlanımlarını azaltabilmektedir. *In vitro* kültürde tercih edilen yağın kimyasal özelliğine göre absorpsiyon yetenekleri farklılık gösterebilmektedir (52). Mineral yağların, reaktif çift bağlı karbonların oksidasyonu ile üretilen peroksitlerin, özellikle mikro damlacık kültüründe deoksiribonükleik asitin (DNA) parçalanmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu durum, embriyo gelişiminde dejenerasyona neden olmaktadır. Ayrıca yağların yüksek oranda kültür vasatına temas yüzeyinin olması, oluşabilecek dejenerasyonun artmasına ve kültür ortamının kirlenmesine neden olur. Oluşan dejenerasyon kullanılan yağın türüne, konsantrasyonuna ve hücrelerin maruz kalma süresine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Sonuç olarak, bu durum elde edilen blastosist oranını düşürmektedir (52,53). Son zamanlarda mineral yağların zararlarını azaltmak için bazı teknikler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri, mineral yağı yıkayarak hacmini küçültmek veya çok miktarda kültür vasatı kullanarak mineral yağın embriyo üzerindeki toksik etkisini azaltmaktır. Mineral yağları yıkamak için %0.9'luk fizyolojik tuzlu su veya sentetik insan tüp sıvısı (HTF) kullanılabilir (52). Mineral yağın olumsuz etkisini azaltmak için bir diğer seçenek de yağsız kültür sistemlerini kullanmaktır. Bu yöntemde ortam su ile çevrelenerek ozmolaritesi stabilize edilebilmektedir. İnek ve domuzlarda yapılan bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen, ineklerde yağsız kültür sistemlerinin kullanımı sonrası embriyo gelişiminde önemli oranda düşüşler meydana gelmiştir (54). Bununla birlikte, mineral yağlardan dolayı oluşabilecek embriyo toksisitesini önlemek için yağlar uygun koşullarda saklanmalıdır. Mümkün olduğunca mineral yağların depolama süresince ısı ve ultraviyole (UV) oksidasyonunu sınırlamak gereklidir. Bu nedenle serin (+4°C'de) ve karanlık bir ortamda muhafazası önerilir. Ayrıca, mineral yağların peroksidasyonunu önlemek için en uygun saklama materyalinin cam şişeler olduğu bildirilmektedir. Embriyo sayısı ve kalitesini artırmak için laboratuvarlarda mineral yağların kullanımı öncesi biyoanaliz testlerinin yapılması önerilmektedir (52).

İnkübatör

In vitro embriyo üretimi yapılan laboratuvarların en önemli ekipmanları inkübatörlerdir. İnkübatörlerin seçimi ve yönetimi, kültür sistemlerinin optimizasyonu için oldukça önemlidir. İnkübatörler, embriyo kültür ortamlarında gaz ve sıvıların seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, inkübatörler ortam sıcaklığını doğrudan düzenler ve embriyoların maruz kaldığı pH'yı dengeler. Mevcut çalışmalarda periyodik olarak inkübatörler açılarak maturasyon, fertilizasyon ve embriyoların kültür aşamasındaki gelişimleri (morfolojisi, büyümesi, kalitesi) takip edilir. Bu işlemler sırasında inkübatörlerin kapaklarının açılarak inkübatör içi gaz ortamının değişimini sağlayarak, gaz ve sıcaklığın ayarlanmasına yardımcı olur. Klasik olarak *in vitro* fertilizasyon veya biyoteknoloji laboratuvarlarında geniş hacim skalasında (50-500 L) inkübatörler kullanılmaktadır. Ancak, *in vitro* fertilizasyon laboratuvarlarında 0.01-1 mL arasında olacak şekilde mikro droplar şeklinde çalışmalar yapıldığı bilinir. Bu durum inkübatörler hakkında bazı soruları akıllara getirmektedir. Örneğin; "İnkübatör hacminin büyük olması gerekli mi?", "İnkübatör hacminin gaz üzerine etkisi var mı?", "Kapağın açılıp kapanması sonrası ısı ve gaz seviyelerinin geri dönüşüm süresini etkiler mi?", "gaz ve ısınin geri dönüşüm süresi embriyo

gelişimini olumsuz etkiler mi?" Bu soruların cevabına istinaden özellikle insan IVF laboratuvarlarında minimalist kabin (benchtop, small box type) şeklinde inkübatörler kullanılmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında inkübatörlerin embriyo gelişimi üzerinde etkilerinin farkı net olarak ortaya konulamamıştır (55). Bugüne kadar, üstün bir inkübatör tipi konusunda net bir fikir birliğine varılamamıştır. Çünkü etkinlik ve çevresel kararlılık büyük ölçüde inkübatör kullanımına ve yönetimine bağlıdır. Laboratuvarlarda inkübatör kapaklarının sürekli açılıp kapanmalarını önlemek için yeterli sayıda inkübatör olması önerilir. İnsan ve farelerde yapılan çalışmalarda inkübatör kapağının çok sık açılması önlenildiğinde elde edilen blastosist oranlarının arttığı bildirilmektedir (56). Günümüzün optimal kültür sistemi, inkübatör içinde düşük oksijen kullanımını gerektirir. Çok sayıda hayvan çalışması, fare, kedi, koyun, domuz, inek ve sıçan dahil olmak üzere, atmosferik seviyelere kıyasla azaltılmış oksijen konsantrasyonları kullanmanın faydalı olduğunu göstermiştir (57).

Uçucu Organikler (Volatile Organics-VOCS)

İnkübatörlerin bulunduğu ortamın atmosfer kalitesinin de embriyo kültür sistemlerinde başarıyı etkilediği bildirilmektedir. *In vitro* fertilizasyon laboratuvarlarının havasında aldehitler, benzen, toluen veya etanol gibi uçucu organik bileşiklerin (volatile organic compounds-VOCS) varlığının, kültür ortamındaki embriyoları tehlikeye atabileceği bildirilmektedir. Uçucu organik bileşikler embriyo toksisitesine neden olabilir. Laboratuvarlarda kötü hava kalitesinin olumsuz etkilerinden kaçınmak gereklidir. Toksik maddelerin laboratuvara, inkübatöre ve kültür ortamına olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya minimize etmek gereklidir. Bu nedenle laboratuvarlar tasarlanırken VOC'ları azaltacak şekilde plan yapılmalıdır. Uçucu organik bileşiklerinin normal atmosferik koşullar altında buharlaşabilen temel olarak insan yapımı kimyasallar olduğu bilinir ve yaygın kaynakları inşaat malzemeleri, ahşap mobilyalar, boyalar, yapıştırıcılar, motorlu taşıt emisyonları ve temizlik ürünleridir. Özellikle laboratuvarlarda kokusuz özel boyaların kullanılması tavsiye edilirken dolgu macunları ile toksik yapıştırıcılardan da kaçınılması önerilmektedir. Ayrıca VOC'ların preimplantasyon öncesi embriyoların gelişimi üzerine de zararlı etkileri olduğu bilinir. Laboratuvarda pozitif basınçlı hava akışı ile hava temizleme sistemlerinin ve inkübatörler için uygun in-line filtrelerin kullanılması, hava kaynaklı kirlenmelerin seviyesini en aza indirmeye ve sonuçları iyileştirmeye yardımcı olacaktır (58,59). Uçucu organik bileşikler laboratuvar içindeki bazı sarf malzemeler gibi (ambalajlar dahil) çeşitli kaynaklardan yayılabilir. Bu amaçla laboratuvarlarda gaz çıkarma süresini belirlemek için bir VOC ölçeği kullanılmalıdır. Ayrıca, laboratuvar personeli de parfüm, deodorant ve sigara kullanımı gibi durumlarda VOC'lara neden olabilir (60).

Kültür Kapları (Petriler)

Embriyo kültürü için yeni mikro veya nano hacimli kültür petrileri geliştirilmekte ve bunların mikro ortamı optimize etmek için kullanılması önerilmektedir. Ayrıca bu petri kapları bireysel embriyo geliştirilmesine, embriyonun metaboliklerinin takibine, genetik analizine ve embriyo izleme çalışmalarına olanak sağlar. Ayrıca, bu petriler bireysel embriyo

kültürünü geliştirebilir veya embriyonun hızlandırılmış görüntüleme veya genetik teşhis için izleme çalışmalarında kullanılabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, well-of-well (WOW) petri kullanılarak mikro volüm ortamları oluşturma yaklaşımının, daha büyük hacimli kültür petri kaplarına kıyasla embriyo gelişimi için daha iyi olabileceğini göstermektedir. Bu WOW petri kullanımında embriyoları tek tek barındırmak için mikro kuyucuklar kullanılabilen ve aynı zamanda tüm embriyolar ortak bir ortamı paylaşarak birbirine yakın bir yerde bulunmaktadır (61). Kültür sistemlerinin optimize edilebilmesi için kullanılan petrilerin non-toksik olması önerilir. Bu nedenle laboratuvarlarda kullanılan petrilerin kalite kontrollerinin yapılması gereklidir. Kalite değerlendirilmesi yapılan petrilerin steril olarak paketlenerek kullanımına kadar saklanması istenir. Genellikle malzemelerin kullanımı öncesi firmaların vermiş olduğu kodlar ile kalitesi kontrol edilebilmektedir. Firmalar petrileri genellikle "önceden test edilmiş" olarak satmaktadır. Ancak bu üreticilerin biyo-analizleri, her laboratuvarın bireysel duyarlılık kriterlerini karşılamayabilir. Ayrıca, uygun olmayan saklama koşulları petrilerin toksik hale gelmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle kültür sistemleri için kullanılacak olan petrilerin muhafazasına dikkat edilmelidir (62).

pH

Bu parametre doğrudan laboratuvarlar tarafından kontrol edildiğinden ve laboratuvarlar arasında önemli ölçüde değiştiğinden, kültür ortamının pH'sı özel bir öneme sahiptir. Ortam pH'sı öncelikle ortamın kendisindeki bikarbonat (HCO_3) konsantrasyonu ve kültür inkübatörünün karbondioksit (CO_2) konsantrasyonu tarafından belirlenir. Ancak laboratuvarın bulunduğu yükseklik (konum olarak), protein takviyesi ve kullanılan farklı vasat türleri gibi faktörlerin tümü pH'yı etkiler. Ayrıca, tek inkübatör kullanımı CO_2 'nin tüm alanda kullanılmasını engelleyebilir. Bu nedenle, bu parametre her bir kullanıcı tarafından kendi laboratuvarının özel koşullarına göre ölçülmeli ve ayarlanmalıdır (63,64). Embriyolar farklı ortam pH'sında gelişebilse de iç pH değişimlerinin embriyo gelişimini, metabolizmasını ve hatta fetal büyümeyi etkileyebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte pH'yı tek başına izole etmek zordur. Bikarbonat ve CO_2 değerlerindeki değişiklikler pH'yı çok hızlı etkilemektedir (55,64). Kültür ortamlarında pH değişimlerini izlemek için fenol kırmızısı sık kullanılan bir kimyasaldır. Ancak bazı çalışmalar fenol kırmızısından kaynaklı eseri miktar östrojenik etkinin ortamı değiştirebileceğini bildirmektedir. Ayrıca fenol kırmızısı kullanımının ışığa maruz kalması ardından reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açabileceği öne sürülmüştür. Ancak, ROS oluşumu modern insan embriyo kültür ortamı kullanılan koşullar altında görülmemiştir. Bu nedenle, fenol kırmızısının olumsuz bir etki yarattığı sonucuna net olarak varılamaz ve görsel bir pH indikatörünün belirli bir laboratuvar için yararlı olması durumunda, seçilen bir ticari preparatın laboratuvar ortamda kullanımı önerilebilir (55). En önemli kültür parametrelerinden biri kültür ortamının dış pH'sıdır (pHe). Çıplak oositler, iç pH'yı (pHi) 7.1'de tutma yeteneğine sahip değildir veya sınırlıdır. Bu nedenle, pHe'nin 7.2 ile 7.3 arasında bir pHi değerinde kalibre edilmesi gerekir. Morula ve blastosist aşamalarındaki embriyoların, erken bölünme aşamasındaki embriyo ve oositlere göre pHi'lerini stabilize etme olasılığı daha yüksektir. Bu aşamalarındaki embriyolarda protonların

hücrelerden dışarı atılmasıyla veya hücre zarında bulunan spesifik taşıma sistemleri aracılığıyla HCO_3 'ın alınması ile sitozollerinin tamponlanması sağlanabilir. Yağsız bir kültür petri kabı inkübatörden çıkarılır ve gazsız bir atmosfere maruz kalırsa, pH'nın kısa bir sürede yükseldiğini bildirilmektedir. Embriyoların inkübasyonu sırasında sıcaklık veya CO_2 konsantrasyonunda yaşanan değişiklikler, kültür ortamının pH'sını etkileyerek embriyo gelişimini olumsuz etkiler (65,66). Hücrelerde hem ROS hem de nitrik oksit (NO) üretiminin artması, mitokondrideki pH gradyanı üzerindeki değişikliklerle belirlenir. Bu nedenle, pH özellikle hücresel mitokondride solunumun başka bir işletim sistemi uyarıcısı olarak kabul edilmiştir. İnsanlarda oosit ve embriyo gelişim sırasında pH'da değişiklikler olduğu ve bu değerlerin oositlerde 6.98-7.03, embriyolarda ise 7.12 civarında olduğu bildirilmektedir. Bunun yanısıra kullanılan medyumlarındaki ortalama pH değeri olan 7.2-7.3'ün oosit ve embriyo gelişimi için uygunluğu hala tartışılmaktadır (66).

Ozmolarite

Ozmolarite, embriyo gelişimini önemli ölçüde etkileyebilen kültür ortamının bir bileşenidir. Yüksek ozmolaritenin embriyo gelişimini durdurabileceği bildirilmektedir. Kültür vasatlarındaki buharlaşmayı etkileyen faktörler, ortam ozmolaritesini de değiştirir. Ozmolaritenin embriyo gelişimi üzerindeki etkisi, temel amino asitler gibidir. Ozmolarite bileşenleri ozmolit görevi görebildiği ve hücrelerin hacim düzenlemesine yardımcı olduğu için, ortam bileşimine bağlıdır. Ozmolarite ticari vasat üreticileri tarafından belirlense de laboratuvarlardaki koşullar ozmolariteyi değiştirebilir ve dolayısıyla embriyo gelişimini etkileyebilir. Kültür vasatlarındaki buharlaşmayı etkileyen faktörler, ortam ozmolaritesinin de değişimine neden olabilir. Ozmolarite değişimlerine; zaman, kullanılan vasat miktarı, hava akışı, nem, mineral yağların kullanımı ve sıcaklık farklılıkları gibi faktörler neden olabilir. Bu nedenle kültür vasatları hazırlanırken titiz olunmalı ve inkübatör içerisindeki buharlaşmalar da göz önünde bulundurulmalıdır. *In vitro* kültür ortamlarında istenilen optimum ozmolaritenin 240-308 mOsm olduğu bildirilmektedir (55).

Nem

Inkübatörlerin nemlendirilmesi, IVEP başarısı için oldukça önemlidir ve embriyo kültürünün ozmolaritesini etkileyebilmektedir. Nem eksikliğinden dolayı oluşan hipertonic ortamda; ROS miktarı artmakta, hücre büyümeye gözlenmemekte, DNA veya mitokondriyal hasar oluşmakta, hücre döngüsü ve apoptozis durmaktadır. Tüm bu olaylar embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir. *In vitro* embriyo üretimi çalışmalarının sonuçlarında; nemli kültür koşulları (285-290 mOsm) ile kuru kültür (308 mOsm) koşulları karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlarının nemli ortamda önemli oranda yüksek olduğunu belirlendi (67,68).

Işık

Işığın, kültür ortamının yağ peroksidasyonuna ve foto-oksidasyonuna neden olarak doğrudan veya dolaylı olarak embriyo gelişimine olumsuz etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Hams-terlarda ve insanlarda yapılan çalışmalar, gözle görülebilir ışığın embriyolar üzerinde toksik etki oluşturduğu ve bu durumun artan ROS oluşumundan kaynaklandığını bildirmektedir.

dir. Aslında, belirli dalga boylarında elektron taşıma zincirlerinin enzimleri tarafından emildiği ve bunun da ROS üretimini artmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bu etkinin, mavi spektrumdaki radyasyonu ekarte edebilen özel filtreler kullanılarak azaltılabileceği bildirilmektedir. Ortamlardaki ROS miktarı artmadan önce bir hücrenin ne kadar süre ışığa maruz kalması gerektiği bilinmemekle birlikte bu sürenin 5 dakikayı geçmemesi istenmektedir (68,69). Ayrıca, mikroskoplarda kullanılan ışık kaynaklarındaki kısa (320-400 nm) ve uzun (400-750 nm) dalga boylarının kromozomal hasar ve mutasyona neden olabileceği bildirilmektedir. *In vitro* kültür ortamlarında istenilen optimum ışık dalga boyu uzunluğu olarak 475-500 nm tavsiye edilmektedir (68).

Gaz Bileşenleri

In vitro embriyo üretiminde farklı memeli türlerinde ovidukt ve uteruslarındaki oksijen seviyeleri değerlendirildiğinde oksijen konsantrasyonunun %2-8 olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *in vitro* embriyo kültürü için fizyolojik oksijenin (%5) yüksek konsantrasyondaki oksijen (%20) seviyelerine göre daha başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Ayrıca hayvanlarda oksijen seviyeleri %5, %10, %15 ve %20 olarak yapılan çalışmalarda sıralı olarak blastosist elde etme oranlarının azaldığı ve oksijen artışı ile orantılı olarak embriyolarda bloklanma (8-16 hücre) gözlemlendiği bildirilmektedir. Buna ek olarak yüksek konsantrasyonlu O₂ varlığında embriyoların gelişiminin de geciktiği fark edilmiştir. Bunun sebebi olarak yüksek oksidatif stresi artırdığı ve bölünmeler sırasında kümülatif etki yaparak embriyo bölünmelerini blokladığı düşünülmektedir. Bu nedenle *in vitro* kültür sırasında %5O₂, %5CO₂ ve %90N₂ gaz karışımı standart olarak kabul edilmiştir (48).

Sıcaklık

In vitro fertilizasyon laboratuvarlarında, CO₂ inkübatörlerinin sıcaklığı *in vivo* koşulları taklit etmek için 37°C'ye ayarlanmaktadır. Bununla birlikte, inkübatörlerin dış ekranından her zaman sıcaklığın doğruluğu kontrol edilemeyebilir. Genellikle tezgâh üzerinde kullanımı tercih edilen inkübatörlerde yaklaşık $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 'lik iç sıcaklık değişimleri görülebilmektedir. Bu nedenle iç sıcaklığın doğrudan embriyo kültür ortamında ölçülmesi tavsiye edilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklar embriyolarda ısı stresine neden olabilir ve ROS'u artırabilir. Bununla birlikte, olarak ani sıcaklık değişimleri mitokondriyal işlevde ve nükleoit yapılarında bozulmalara, hücre modifikasyonu ve kromatinlerde çökelmelere neden olabilmektedir. Ancak sığır embriyolarının diğer türlere göre sıcaklığa daha dayanıklı olduğu da bildirilmektedir. Buna rağmen taşıma sırasında sıcaklığı stabilize etmek için, manipülasyonların ve çevresel koşulların kültür ortamının ısı kaybını nasıl etkileyebileceğini dikkate almak önemlidir (66).

In vitro embriyo üretiminde tüm bu koşulların yanı sıra laboratuvar personelinin tecrübesi ve manipülasyonlarının da başarıyı etkilen faktörler arasında yer aldığı unutulmamalıdır (48).

SONUÇ

Sonuç olarak, IVEP'te başarıyı artırabilmek için IVF laboratuvarlarında ortamın optimize edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle IVEP'in en önemli basamaklarından biri olan *in vitro* kültür sürecinde, başarıyı etkileyebilecek çevresel faktörler (mineral yağlar, inkübatör, VOCs, petrilere, pH, ozmolarite, nem, ışık, gaz bileşenleri ve sıcaklık) göz ardı edilmemelidir.

FİNANSAL BEYAN

Derlemenin oluşturulmasında herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

YAZAR KATKILARI

FS; yazım, gözden geçirme ve düzenleme, **AS;** yazım ve taslak oluşturma, **YED;** yazım ve taslak oluşturma.

KAYNAKLAR

1. Seidel GE (2007). New technologies for reproduction in cattle. In: Proceedings, applied reproductive strategies in beef cattle, Billings, Montana.
2. Gadisa M, Furgasa W, Duguma M (2019). Review on embryo transfer and It's application in animal production. *AJMS*, 1(1):4-12.
3. Alkan H, Tekindal MA, Demirel MA et al. (2024). Effect of strategies to increase progesterone levels on fertility of bovine embryo transfer recipients-A meta-analysis. *Theriogenology*, 215:177-186.
4. Günlü A, İmİK H, Tekerli M (2001). Afyon ili süt sığırcılık işletmelerinin genel özellikleri ile karlılık ve verimlilik analizleri. *Lalahan Hay Araş Enst Derg.*, 41(1):1-12.
5. Madan ML (2005). Hayvan biyoteknolojisi: gelişmekte olan ülkelerdeki uygulamalar ve ekonomik çıkarımlar. *Rev Sci Tech Int Epiz.*, 24-1:127-139.
6. Bülbül B, Dursun Ş, Kırbaş M et al. (2010). Düvelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 16(1):105-109.
7. Abdoon ASS (2005). Factors affecting In vitro production of bovine embryos. Erişim adresi: <http://esarf2.tripod.com/abdoon.html>. Erişim tarihi: 12.05.2023.
8. Viana J (2019). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4):17.
9. Saleh WM (2017). Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and Invitro fertilization of abattoir specimens. *Iraqi J Vet Sci.*, 31(1):55-65.
10. Satılmış F (2019). The effects of different antioxidants (pentoxifylline and boric acid) on embryo development and quality supplement in vitro bovine embryo culture mediums. Ph.D. Thesis, Selçuk University Health Sciences Institute, Konya.
11. Gordon I (2003). Laboratory production of cattle embryos, Vol. 27. Cabi.
12. Pool TB, Atiee SH, Martin JE (1998). Oocyte and embryo culture: basic concepts and recent advances. *Infertil Reprod Med Clin N Am.*, 9:181-204.
13. Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livest Sci.*, 121(2-3):141-149.
14. Blanco MR, Demyda S, Moreno Millán M et al. (2011). Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. *Biotechnol Mol Biol Rev.*, 6(7):155-165.
15. Rizoş D, Ward F, Duffy PAT et al. (2002). Con sequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.*, 61(2):234-248.
16. Krisher RL, Lane M, Bavister BD (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod.*, 60:1345-1352.

17. Lonergan P, Fair T, Corcoran D et al. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65:137-152.
18. Wrenzycki C (2018). In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Ani Reprod.*, 13(3):279-282.
19. Akyol N, Sulu N (2005). Östrustaki inek serumu ve fetal buzağı serumunun in vitro embriyo elde edilmesine etkisi. *Lalahan Hay Araş Enst Derg.*, 45(1):1-8.
20. Piletz JE, Drivon J, Eisenga J et al. (2018). Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum. *Cell Medicine*, 10:1-11.
21. Verma A, Verma M, Singh A (2020). Animal tissue culture principles and applications. In: *Anim Biotechnol.*, 269–293.
22. Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.*, 1:91-148.
23. Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM et al. (2002). Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. *Arq Bras Med Vet Zoot.*, 54:396-404.
24. Chauhan MS, Palta P, Das SK et al. (1997). Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 48:461-469.
25. Chauhan MS, Singla SK, Palta P (1998). In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) embryos: effects of oocytes quality and type of serum. *Reprod Fertil Dev.*, 10:173-177.
26. Gardner DK (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev.*, 20, 9-18.
27. Gruber I, Klein M (2011). Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turkish German Gynecological Assoc.*, 12(2):110-117.
28. Lane M, Gardner DK (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Reprod.*, 102(2):305-312.
29. Keskindepe L (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod.*, 52(6):1410-1417.
30. Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4):735-744.
31. Vanroose G, Van Soom A, de Kruijff A (2001). From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim.*, 36:25-28.
32. Waldrop JG, Stringfellow DA, Riddell KP et al. (2004). Different strains of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62(1-2):45-55.
33. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR et al. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.*, 14:667–672.
34. Monaco E, De Rosa A, Attanasio I et al. (2006). In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in the presence or absence of glucose. *Reprod Dom Anim.*, 41(4):332.
35. Guerin P (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2):175-189.
36. Alkan KK, Satilmis F, Sonmez G et al. (2024). Putrescine Supplementation Improves the Developmental Competence of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Theriogenology*, 231(1):133-143.
37. Bucak MN, Satilmis HK (2010). Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 16(1):69-74.
38. Raty M, Ketoja E, Pitkänen T et al. (2011). In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*, 63(3):245-255.
39. Satilmis F (2022). Bovine In Vitro Embryo Production (IVEP). In: Abbas RZ, Khan A, Liu P and Saleemi MK (eds). *Animal Health Perspectives*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, Vol. I, 187-193.
40. Truong TT, Soh YM, Gardner DK (2016). Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod.*, 31(7):1445-1454.
41. Gasparri B, Neglia G, Di Palo R (2000). Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54(9):1537-1542.
42. Wang X, Falcone T, Attaran M et al. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78(6):1272–1277.
43. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskindepe L et al. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.*, 16:893-890.
44. Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A et al. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev.*, 17(2):23-35.
45. Aguila L, Treulen F, Therrien J et al. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(12):2196.
46. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod.*, 3:15.
47. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D et al. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.*, 67:767-775.
48. Wale PL, Gardner DK (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod.*, 22(1):2-22.
49. Baltz JM (2012). Media composition: salts and osmolality. *Methods Mol Biol.*, 912:61-80.
50. Leese HJ (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reprod.*, 143:417-427.
51. Hughes PM, Morbeck DE, Hudson SB et al. (2010). Peroxides in mineral oil used for in vitro fertilization: defining limits of standard quality control assays. *J Assist Reprod Gen.*, 27(2-3):87-92.
52. Ebrahimi M, Mara L, Parham A et al. (2022). Mineral Oil for in vitro Embryo Production: What We Should Know? *Arch Razi Inst.*, 77(4):1325-1330.
53. Blaschka C, Diers S, Aravina M et al. (2021). Evaluation of a small volume oil-free in vitro production system for bovine embryos. *Vet Med Sci.*, 7(3):868-875.
54. Van Soom A, Mahmoudzadeh AR, Christophe A et al. (2001). Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. *Reprod Domest Anim.*, 36(3-4):169-176.
55. Swain JE (2015). Optimal human embryo culture. In *Seminars in reproductive medicine*, 33(2):103-117.
56. Zhang JQ, Li XL, Peng Y et al. (2010). Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online*, 20(4):510-515.
57. Thomas T (2012). Culture systems: air quality. *Methods Mol Biol.*, 912:313-324.

58. **Merton JS, Vermeulen ZL, Otter T et al. (2007).** Carbon-activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 67(7):1233-1238.
59. **Khoudja RY, Xu Y, Li T et al. (2013).** Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *J Assist Reprod Gen.*, 30(1):69-76.
60. **Inamdar A, Moore J, Cohen R et al. (2012).** A model to evaluate the cytotoxicity of the fungal volatile organic compound 1-octen-3-ol in human embryonic stem cells. *Mycopathologia*, 173:13–20.
61. **Smith GD, Takayama S, Swain JE (2012).** Rethinking in vitro embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. *Biol Reprod.*, 86(3):62-71.
62. **Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL et al. (2013).** Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum Reprod.*, 28(7):1776-1782.
63. **Lane M, Lyons EA, Bavister BD (2000).** Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. *Hum Reprod.*, 15(2):389-394.
64. **Squirrell JM, Lane M, Bavister BD (2001).** Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biol Reprod.*, 64(6):1845-1854.
65. **Group Cairo Consensus (2020).** There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: Everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reprod Biomed Online*, 40:33-60.
66. **Agarwal A, Maldonado Rosas I, Anagnostopoulou C et al. (2022).** Oxidative stress and assisted reproduction: a comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. *Antioxidants*, 11(3):477.
67. **Armstrong S, Bhide P, Jordan V et al. (2019).** Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 5, Cd011320.
68. **Chi HJ, Park JS, Yoo CS et al. (2020).** Effect of evaporation-induced osmotic changes in culture media in a dry-type incubator on clinical outcomes in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Clin Exp Reprod Med.*, 47:284–292.
69. **Nakayama T, Noda Y, Goto Y et al. (1994).** Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*, 41:499-510.

Gıda Kaynaklı “Büyük Altı” Tehlikesi

Tahacan HİM^{1,a}, Samet TOPÇUOĞLU^{1,b}, Karlo MURATOĞLU^{2,c,✉}

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Avcılar, İstanbul, TÜRKİYE

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Avcılar, İstanbul, TÜRKİYE

ORCID: ^a0000-0003-2353-9351, ^b0000-0001-7458-5492, ^c0000-0001-8705-6813

✉ Sorumlu Yazar

Karlo MURATOĞLU
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa,
Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve
Teknolojisi Bölümü, Avcılar,
İstanbul, Türkiye

karlomrt@iuc.edu.tr

Received
03.06.2024

Accepted
15.04.2025

Published
30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1489397

How to cite: Him T, Topçuoğlu S, Muratoğlu K (2025). Gıda Kaynaklı “Büyük Altı” Tehlikesi. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):79-85.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).



Öz

Gıda kaynaklı hastalıklar, ciddi sağlık problemlerine ve önemli ekonomik kayıplara yol açabilen, enfeksiyöz ya da toksik karakterli hastalıklardır. Bu hastalıklar, dünya çapında yıllık 600 milyon hastalığa ve 420 000 ölüme sebep olmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıkların çoğunluğunu, mikroorganizmalar ile bunların ürettiği toksinler oluşturmaktadır. En önemli gıda kaynaklı enfeksiyon etkenlerinden biri *Escherichia coli* (*E. coli*)’dir. *E. coli* suşları, sebep oldukları hastalıklara, virulans faktörlerine, hastalarda oluşturdıkları klinik semptomlara, bağırsak mukozası ile olan etkileşimlerine, epidemiyolojilerine ve serotiplerine göre sınıflandırılarak altı grupta toplanır. Son yıllarda bu serotiplerden halk sağlığı için önemli bir tehdit olarak görülen, shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) literatürde ön plana çıkmıştır. *E. coli* O157, dünya üzerinde başta küçük çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarındaki bireyleri etkileyerek, önemli sağlık problemlerine sebep olan, en fazla bilinen STEC serotipiydi. Fakat son yıllarda *E. coli*’nin neden olduğu ciddi enfeksiyon tablolarından diğer serogrupların da izole edilmesi ciddi endişelere yol açmıştır. Bunun üzerine ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), “Büyük Altılı (Big Six)” olarak bilinen, gıdalarda bulunan ve O157 dışı altı serogrup *E. coli* (O26, O45, O103, O111, O121 ve O145) tanımlamıştır. Bu serogruplardan kaynaklanan salgınlar ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) ve Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA)’nın raporlar yayınlamasına sebep olmuştur. Bu derlemede, günümüzde sıklıkla karşılaşılan ve önemli halk sağlığı problemlerine sebep olan Büyük Altılı (Big Six) *E. coli* serogruplarının önemi ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Büyük Altılı *E. coli*, *E. coli*, gıda kaynaklı hastalıklar, salgın, STEC

The Threat of Foodborne "Big Six"

Abstract

Foodborne diseases are infectious or toxic diseases that can cause serious health problems and significant economic losses. These diseases cause 600 million illnesses and 420 000 deaths worldwide annually. Most foodborne diseases are caused by microorganisms and the toxins they produce. One of the most important foodborne infectious agents is *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* strains are classified into six groups according to the diseases they cause, virulence factors, clinical symptoms they cause in patients, their interactions with the intestinal mucosa, epidemiology and serotypes. In recent years, among these serotypes, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), which is seen as an important threat to public health, has come to the forefront of the literature. *E. coli* O157 was the most well-known STEC serotype in the world, affecting individuals of all age groups, especially young children, and causing significant health problems. However, in recent years, the isolation of other serogroups from serious infections caused by *E. coli* has raised serious concerns. In response, the US Food and Drug Administration (FDA) identified six non-O157 serogroups of *E. coli* (O26, O45, O103, O111, O121 and O145) found in foods, known as the "Big Six". Outbreaks from these serogroups have led to reports from the US Centres for Disease Control and Prevention (CDC) and the European Food Safety Authority (EFSA). This review discusses the importance of the Big Six *E. coli* serogroups, which are frequently encountered today and cause significant public health problems.

Key Words: Big Six *E. coli*, *E. coli*, epidemic, foodborne diseases, STEC

GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalık, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından "gıda ya da suyun tüketimi sonucu oluşabilen enfeksiyöz ya da toksik karakterdeki hastalık" şeklinde tanımlanmaktadır. Bilinen 200'den fazla gıda kaynaklı hastalık ile bu hastalıklara sebep olan birçok mikroorganizma bulunmaktadır (1). Güvenilir olmayan gıda, dünya çapında yıllık 600 milyon gıda kaynaklı hastalığa ve 420 000 kişinin ölümüne neden olmaktadır. Düşük ve orta gelirli ülkelerde güvenilir olmayan gıdalardan kaynaklanan ekonomik kayıp yaklaşık 110 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (2). Centers for Disease Control and Prevention (CDC), ABD'de her yıl gıda kaynaklı hastalıklardan 48 milyon kişinin hastalandığını, 128 000 kişinin hastanede tedavi gördüğünü, 3 000 kişinin ise öldüğünü bildirmektedir (3).

Gıda kaynaklı hastalıklar hem halk sağlığına hem de ekonomiye büyük zararlar vermekte, bu hastalıklardan etkilenen bireylerin ciddi boyutlu sağlık problemleri yaşamasına sebep olmaktadır (4). Gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren çeşitli etkenler bulunmaktadır. Bunlar; fiziksel etkenler, kimyasal etkenler ve biyolojik etkenlerdir. Gıda kaynaklı hastalıkların en önemli sebebi ise patojen mikroorganizmalardır (5). Mikrobiyal gıda kaynaklı hastalıklar, patojen bir mikroorganizma ya da onun üretmiş olduğu toksinin gıdalar ile alınması sonucu ortaya çıkan ve çoğunlukla gastrointestinal semptomlara yol açan hastalıklardır (6).

Mikrobiyal gıda kaynaklı hastalıkların en sık izole edilen sebeplerinden bir tanesi de *Escherichia coli* (*E. coli*)'dir. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan, gram (-), çubuk şekilli (7), spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif bir bakteridir. *E. coli* sıcaklığa direnç göstermezken, soğuk ve donuk muhafaza şartlarında canlılığını sürdürmektedir (8). *E. coli*'nin sınıflandırılmasında flagellar (H), kapsular (K) ve somatik (O) antijenleri baz alınır ve Kauffman şeması kullanılır (9). *E. coli*, çevresel koşullara iyi adaptasyon gösterir, 7-49°C sıcaklık aralığında, pH 4.5-9 aralığında, %6.5'lik tuz konsantrasyonlarında canlılık ve gelişim gösterebilmektedir. *E. coli*'nin varlığını devam ettirebileceği minimum su aktivitesi değeri 0.95 iken, optimal değer ise 0.99'dur. Bakterinin optimum üreme sıcaklığı ise 35-37°C'dir (10). *E. coli*'nin ETEC suşları 4°C'de de üreme gösterebilmektedir. Bununla beraber diğer üreme koşullarının da uygun olması durumunda asidik ortamlarda da üreme gösterebildiği bildirilmektedir. İnsanların kalın bağırsaklarında *E. coli*'nin düzeyi 10^6 kob/g'dır. (8). Gıdalarda veya herhangi bir ortamda *E. coli* bulunması, fekal bulaşma gerçekleştiğinin kanıtıdır. Diğer bir ifadeyle *E. coli* gıdalarda fekal bulaşma indikatörüdür (11). *E. coli*, mikrobiyotası olarak varlığını sürdürdüğü canlılarda kommensal bir bakteri olarak diğer mikroorganizmalarla beraber karşılıklı yarar sağlayacak şekilde yaşar ve düşük de olsa canlılarda hastalığa sebebiyet verir. Buna rağmen, insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlardaki en yaygın patojen mikroorganizmalardan biri olup, geniş bir hastalık ağından sorumludur. İnsanlarda gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına sebep olan *E. coli* türleri altı gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Diffüz adherent *E. coli* (DAEC)'dir (12).

ENTEROHEMORAJİK *E. COLI* (EHEC) EPİDEMİYOLOJİSİ

EHEC ilk kez 1982 yılında kanlı ishal ve gastrointestinal bozukluğu olan bir hastadan izole edilmiş ve dünya çapında bir pandemiye yol açmıştır (13). EHEC suşları, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen shiga benzeri toksinleri üretir ve bu özelliği ile onları günümüze değin bilinen en ölümcül ishale sebep olan *E. coli* türü yapar. Bu yönüyle shiga toksin üreten (STEC) *E. coli* olarak da adlandırılır (14).

STEC, 7-50°C aralığındaki sıcaklıklarda üreyebilmekte olup, bakterinin optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Bazı STEC'ler pH'sı 4,4'e kadar olan asidik gıdalarda ve minimum su aktivite değeri 0,95 olan gıdalarda gelişim gösterebilmektedir. Gıdaların tüm noktalarına uygulanan 70°C ve üzerindeki sıcaklıklarda STEC inhibe edilebilmektedir (71). EHEC için minimal enfektif dozun düşük olduğu kabul edilmektedir. Etkenin klinik belirtilere yol açacak dozu 10-100 organizma arasındadır (15).

STEC kaynaklı enfeksiyonlar, Avrupa Birliği (AB)'nde insanlarda en çok bildirilen dördüncü gastrointestinal gıda kaynaklı hastalıklardır. 2022'de AB'de, 7 117 doğrulanmış STEC enfeksiyonu vakası bildirilmiştir. Bu, AB'nin 100 000 nüfus başına 2.1 vaka bildirim oranına karşılık gelir. Bu oran 2021'e kıyasla %8.8'lik bir artışı göstermiştir. Bildirilen vakalar, pediatrik yaşlara (0-19 yaş) karşılık gelen vakalarda, tüm vakaların %44.1'i, özellikle 0-9 yaş arası çocuklarda ise %34.8'i oluşturmaktadır. 2022 yılında AB ülkeleri arasında en yüksek bildirim oranları 100.000 kişilik nüfus başına İrlanda (17.6 vaka), Malta (15.0 vaka), İsveç (8.2 vaka) ve Danimarka (7.0 vaka)'da gözlemlenmiştir (16).

EHEC'in bulaşmasında gıdalar önemli yer tutmaktadır. Özellikle hayvansal gıdalarla bulaşmada, yetersiz ısı işleme maruz kalmış kıyma ve kıyma ile hazırlanmış yemekler ile çiğ süt önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kişiden kişiye bulaşma ve çapraz kontaminasyon sonucu bulaşma da göz ardı edilmemelidir (3). Çift tırnaklı hayvan dışkıyla kontamine olan sular, sebzeler, sırasız elma suları ve çift tırnaklı hayvanlara doğrudan temas sonucunda şekillenen bulaşma yolları dikkat çekicidir (17). Geviş getiren hayvanlar STEC ile enfekte olduklarında asemptomatik olarak hastalığı taşırlar ve etken gastrointestinal sistemlerinde canlılığını sürdürür (18). Sığırlar EHEC kaynaklı hastalıkların en önemli kaynağıdır (19). Sığırlar dışkı ile çevreye etkeni saçarlar. Sığırların haricinde, kedi, koyun, keçi, geyik, bufalo ve domuzlarda da bu bakteri bulunabilmektedir (11). Sığır dışkısı üretim, işleme, taşıma gibi aşamalarda deriyi kontamine ederek, karkasların ve kırmızı et ürünlerinin kontaminasyon riskini artırır. Bu sebeple, sığır dışkısı kesim anında meydana gelebilecek potansiyel riskin göstergesidir (20).

EHEC'in bilinen en patojen ve en yaygın örneği olan O157:H7, insanlarda hemolitik üremik sendrom (HÜS), hemorajik kolit (HK), trombotik trombositopenik purpura (TTP) gibi önemli sağlık problemlerine sebebiyet vermekte olup, halk sağlığını tehdit etmektedir (21). 2022'de, AB'de doğrulanmış insan vakaları arasında en sık rapor edilen STEC serogrubu O157'dir (16).

VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

E. coli'nin birçok virülans faktörü bulunmaktadır. Toksin üretimi, demir transport sistemi, serum direnç yeteneği, biyofilm oluşumu, adezinler ve kapsüller bunlardan birkaçıdır. Bu

faktörler, doku kolonizasyonunu teşvik eder, dokularda hasar oluşturur ve hastalıkların uzak noktalara yayılımına neden olur. Bu virülans özellikleri ile, mikroorganizma anatomik ortamları kolonize edebilir, konakçı savunma mekanizmalarını geçersiz kılabilir ve konakçıda inflamatuvar bir tepkiye sebep olabilir (22). Patojenitelerine etki eden ana etmen, shiga toksin *stx1* ve *stx2* şeklinde ifade edilen iki güçlü faj kodlu sitotoksin üretme kapasiteleridir. Bu toksinler, tıpkı bir bitki toksini olan risin gibi organizmaya etki eder. Başlıca endotelial hücrelerde ve diğer hücrelerde protein sentezini engelleyerek etki gösterir (23). *Stx1* ve *stx2* kendi içerisinde çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. *Stx1*; *stx1a*, *stx1c* ve *stx1d* olarak üç alt tip; *stx2* ise, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* ve *stx2g* olmak üzere toplam yedi farklı alt tür içermektedir (24).

Bir diğer virulans ile etkili faktör ise intimin adı verilen bir proteindir. İntimin, *eae* geni tarafından kodlanıp, STEC'in bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasını sağlayarak, hücrelerde lezyonlara sebep olur (23). Bununla beraber *E. coli* O157:H7'nin içermiş olduğu spesifik demir transport sistemi, canlı organizmada hem veya hemoglobini demir kaynağı olarak kullanabilmektedir (8).

HASTALIK OLUŞUMU VE SEMPTOMLARI

STEC'in sindirim yoluyla vücuda alınmasından hastalığın hissedilmesine kadar geçen dönem "kuluçka dönemi" olarak tanımlanır. Bu dönem, etkene maruz kalınmasından sonraki 3-4 günlük periyottur. Ancak bu süre çeşitli etkilere bağlı olarak 1 ila 10 gün arasında değişebilmektedir. Hastalığın semptomları, genellikle hafif karın ağrısı ya da diyare ile başlar. Birkaç gün içerisinde semptomlar ağırlaşır. İlk belirtilerin ortaya çıkmasından yaklaşık 7 gün sonra, HÜS meydana gelebilmektedir (25). HÜS; akut böbrek hasarı, mikroanjiopatik hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterize bir durumdur. Çocuklarda meydana gelen akut böbrek problemlerinin bilinen en sık sebeplerindendir. HÜS'ün klinik bulguları, trombotik mikroanjiopati (TMA) sonucu görülür. Arteriol ve kapiller duvarlarda kalınlaşma, endotellerin genişlemesi ve tahribata uğraması bu hastalığın patolojik etkilerindendir. HÜS sonucu pek çok doku ve organ hasara uğrar (26). Hastalar yaşamlarını devam ettirseler dahi, böbreklerinde meydana gelen bozukluklar ve böbrek yetmezliği sonucu diyaliz makinesine bağımlı olmaktadır (27) ve bu durum ciddi boyutlu tedavi maliyetlerine yol açmaktadır (28).

STEC kaynaklı HÜS, çocuklarda akut böbrek hasarının en önemli nedenidir (29). HÜS, Avrupa ve Kuzey Amerika'da 15-18 yaş aralığındaki çocuklarda yıllık 100 000 vakada 0.6-0.8 vaka iken, 3-5 yaş aralığındaki çocuklarda ise 1.9-2.9 vaka olarak tahmin edilmektedir (30).

2022 yılında STEC kaynaklı HÜS görülen 16 yaşından küçük çocuklarda, hastalığın nörolojik etkilerine yönelik bir araştırma yayınlanmıştır. 240 çocukta 202'sinde STEC enfeksiyonu doğrulanmış olup, çocuklarda %11 oranında nörolojik tutulumun meydana geldiği açıklanmıştır (29).

STEC insidansının en yüksek olduğu periyot, kuzey yarımkürede Haziran ve Eylül ayları arasındadır. Sığır insidansındaki yoğunluk, kommensal taşıma oranları, kırsal konum, sıcak hava ve ardından gerçekleşen yağış gibi farklı faktörler *E. coli*'nin bulaşmasındaki bu mevsimselliğin temelinde yatan sebepler olarak görülmektedir (31).

O157 DIŞI SHİGA TOKSİJENİK *E. COLI* SEROGRUPLARI

O157 dışı STEC enfeksiyonlarının görülme sıklığı son yıllarda düzenli bir şekilde artmaktadır. O26, O45, O103, O111, O121, O145 serogrupları, ABD'de O157 dışı STEC enfeksiyonlarının büyük kısmından sorumludur ve halk arasında "Büyük Altılı *E. coli*" olarak adlandırılırlar (32).

O157 dışı STEC enfeksiyonlarına yönelik spesifik tanı metotlarının bulunmaması nedeniyle, bu serogrupların meydana getirmiş olduğu hastalıklara yönelik etkiler hafife alınmıştır (33).

O157 dışı STEC enfeksiyonları pek çok ülkede daha büyük problem olarak görülmektedir. Avrupa'da tespiti yapılan STEC enfeksiyonlarının %50'lik bölümü O157 dışı türlerden meydana gelmektedir. Ayrıca, Avrupa'daki O157 dışı STEC kaynaklı enfeksiyonların sayısı, ABD'deki O157 vakalarından daha yüksektir (34).

2022'de, AB'de tespiti yapılmış vakalar arasında STEC O157 serogrubu sonrasında en sık rapor edilen serogruplar O26, O103 ve O146'dır. Buna karşılık HÜS'ten izole edilen STEC suşları dikkate alındığında en yaygın serogrup O26 (vakaların yarısından fazlası) iken, onu O157, O80 ve O145 serogrupları takip etmektedir (16). CDC, O157 dışı STEC kaynaklı enfeksiyonların %70'inin diğer altı O serogrubu (O26, O45, O103, O111, O121, O145) tarafından oluşturulduğunu bildirmiştir (35). ABD ve bazı ülkeler, Büyük Altılı *E. coli*'nin halk sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle, Büyük altılı *E. coli* serogruplarını içeren et ürünlerinin satışını yasaklayan uygulamalar ortaya koymuştur (36).

BÜYÜK ALTILI *E. COLI* SEROGRUPLARI VE ÖNEMLİ SALGINLAR

STEC O26

O26, hem virulans faktörlerine bağlı olarak Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ya da Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) şeklinde kategorize edilmektedir. STEC O26, insanlarda görülen HÜS ve HK ile alakalı en yaygın O157 dışı STEC serogrubu olmasına rağmen (37), EPEC O26 daha az şiddetli ishal olgularına sebep olur (38). STEC O26 ile STEC O26:H111 ishal, kanamalı ishal ve HÜS ile ilişkili enfeksiyonlara sebep olmaktadır. STEC O26'nın ilk olarak pediatrik EPEC ishaline sebep olduğu belirlenmiştir. Japonya, Güney Amerika ve Avrupa'daki birçok EHEC salgınlarından sorumlu tutulduğu tespit edilmiştir (39).

STEC O26 kaynaklı enfeksiyonlarda, ishal semptomları iyileştikçe HÜS görülebilmektedir. Ancak bu etkenden kaynaklı vakalarda HÜS sporadik olarak gerçekleşmektedir. HÜS vakaları yaş fark etmeksizin görülmekle birlikte, en sık çocuklarda ve yaşlılarda görülmektedir (40).

STEC O26, *E. coli* O157 ile benzer hastalıklara sebep olabilmektedir. *E. coli* O26, *E. coli* O157 ile aynı toksin tipini üretmekte olup, böbreklerde hastalık yapmaya sebep olma ihtimali daha azdır (41). *E. coli* O157 gibi bulaşıcı dozu düşüktür. Evlerde ve çocukların bulunduğu ortamlarda kişiden kişiye bulaşmaların görüldüğü açıklanmıştır (42).

2007 yılında Belçika'da STEC O145 ve O26 kaynaklı, 12 kişinin etkilendiği 5 HÜS vakasının meydana geldiği bir salgın meydana gelmiştir. Salgının kaynağının dondurma olduğu tespit edilmiştir (43). 2007 yılında Danimarka'da STEC O26 kaynaklı, sığır sosisinden meydana gelen 20 vaka gerçekleşmiştir (44). 2012 yılında ABD'de toplam 11 eyalette 29 kişinin

etkilendiği, STEC O26 kaynaklı bir salgın gerçekleşmiştir. Bu salgına, restoranlarda tüketilen çiğ yonca filizlerinin sebep olduğu tespit edilmiştir (40). 2015 yılında ABD’de STEC O26 kaynaklı iki ayrı salgın gerçekleşmiştir. Meydana gelen ilk ve daha büyük olan salgın ABD’nin toplam 11 eyaletinde görülmüş, 55 kişi salgından etkilenmiş, 21 kişi hastanede tedavi altına alınmıştır. İkinci ve daha az sayıda kişiyi etkileyen salgın ise toplam 3 eyalette görülmüş ve 5 kişi etkilenmiş, 1 kişi ise hastanede tedavi altına alınmıştır. Araştırmacılar hastalığa sebep olan STEC O26’ya yönelik DNA parmak izleri hakkında kapsamlı bir araştırma yapmak için tüm genom dizilimi yöntemini kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda, ikinci salgındaki hastalardan elde edilen izolatlar ile ilk salgındaki hastalardan elde edilen izolatların genetik olarak benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Araştırmalardan elde edilen epidemiyolojik veriler, salgından etkilenen kişilerin aynı restorandan yemek yediklerini göstermiştir. Restorandan alınan gıdalar incelendiğinde ise, STEC O26 tespiti yapılamamıştır (45). 2016 yılında ABD’de meydana gelen, 24 eyaleti kapsayan, 63 kişinin etkilendiği STEC O121 ve O26 kaynaklı salgında, 17 kişi hastanede tedavi görmüş, 1 kişide HÜS gerçekleşmiştir. Yapılan araştırmalarda, salgının kaynağının un olduğu ve unlardan alınan numunelerde O121 ve O26 tespit edilmiştir (46). 2018 yılında ABD’de 4 eyalette, 18 kişinin etkilendiği, 6 kişinin hastanede tedavi gördüğü, 1 kişinin HÜS geçirdiği, 1 kişinin öldüğü STEC O26 kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Salgının kaynağının kıyma olduğu tespit edilmiştir (47). 2019 yılında ABD’de STEC O26 kaynaklı, 9 eyaleti kapsayan, 3 kişinin hastanede tedavi gördüğü bir salgın meydana gelmiştir. Salgının kaynağının un olduğu belirlenmiştir (48).

STEC O45

E.coli STEC O45 serogrubu, O157 dışı STEC serotipleri arasında sporadik kanlı ishal vakalarına sebep olan serogruttur (49). Tespiti yapılan ilk STEC O45 salgını, 2005 yılında ABD’deki bir hapishanede gerçekleşmiştir. Bu salgına, hasta bir gıda çalışanının sebep olduğu değerlendirilmiş, toplam 52 mahkûm ishal veya kanlı ishal semptomları göstererek hastalığa maruz kalmıştır (50). Sonraki dönemlerde, ABD’de STEC O45:H2 serogrubu ile salgınlar meydana gelmiştir. Bu salgınlarda 18 hastalık rapor edilmiş ve salgınların kaynağı olarak kontamine tütsülenmiş keçi ve av hayvanlarının etinin hastalığa sebebiyet verdiği bildirilmiştir (51). 2023 yılında Birleşik Krallık’ta STEC O45 kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Bu salgında, doğrulanmış en az 30 vaka bildirilmiştir. Salgına sebebiyet veren ürünlerin, aynı markaya ait farklı türde peynirler olduğu açıklanmıştır (52).

STEC O103

STEC O103 serogrubunun, kanlı ishal, kolit ve HÜS ile ilişkili küresel çaptaki vakalarda tespiti yapılmıştır (53). STEC O103:H2, Avrupa’da insanlarda görülen hastalık vakalarından tespiti yapılan en yaygın O157 dışı STEC serogruplarından dandır (54). 2006 yılında Norveç’te, STEC O103:H25 kaynaklı salgın hastalık yaşanmıştır. Bu salgında toplam 17 vaka gerçekleşmiştir. Vakaların 16’sında ishal, 10’unda HÜS meydana gelmiş ve bir de ölüm vakası gerçekleşmiştir. Ayrıca bu salgın, yüksek oranda HÜS gerçekleşmesi ile karakterizedir. Salgına kirlenmiş koyun sosisinin sebep olduğu tespit edilmiştir. Hastalardan alınan dışkı örneklerinde, 11 hastada dışkı kültürlerinde *E. coli* O103:H25 pozitif çıkmıştır. Tespiti yapılan

dışkı kültürlerinin dokuzu stx-negatif, yalnızca iki tanesi stx2-pozitif çıkmıştır (55). 2017 yılında Almanya’da meydana gelen STEC O103:H2 kaynaklı salgın, Avusturya’ya yapılan bir okul gezisinde çiğ inek sütü tüketimi sonucu meydana gelmiştir. Öğrencilerin ve öğretmenlerin olduğu 200 kişiden 45’inde hastalık semptomları görülmüştür (56).

2019 yılında ABD’de toplam 10 eyalette 209 kişinin enfekte olduğu STEC O103 kaynaklı salgında, 29 kişi hastanede tedavi altına alınmış olup, 2 kişide HÜS gerçekleşmiştir. Salgına kıymanın neden olduğu tespit edilmiştir (57). 2019 yılında ABD’de toplam 8 eyalette 33 kişinin enfekte olduğu STEC O103 ve O121 kaynaklı salgında, STEC O103’le 8 kişi, STEC O121 ile 21 kişi, her iki serogrup ile de 4 kişi enfekte olmuştur. Salgında etkilenen 31 kişiden 18’i hastanede tedavi altına alınmış olup, hastalığa bizon eti ve bizon etinden yapılmış köftenin sebep olduğu tespit edilmiştir (58). 2020 yılında, ABD’de toplam 10 eyalette, 51 kişinin enfekte olduğu STEC O103 kaynaklı salgında 3 kişi hastanede tedavi görmüştür. Hastalığa yonca filizlerinin sebep olduğu tespit edilmiştir (59).

STEC O111

Tespiti yapılan salgınlarda, STEC O111 serogrubunun insanlarda ciddi boyutlarda gastroenteritis ve HÜS içeren salgınlara sebep olduğu tespit edilmiştir. 1987 yılının Kasım ayında Finlandiya’da altı gün süren, STEC O111 kaynaklı bir salgın gerçekleşmiştir. Bir okulda meydana gelen bu salgında büyük çoğunluğunun 7 ile 19 yaş aralığında olduğu 611’i öğrenci, toplam 700’ü aşkın kişi etkilenmiştir (60).

1995’te Avustralya’da STEC O111’den kaynaklanan, 158 kişinin etkilendiği sosis tüketiminden kaynaklı bir salgın gerçekleşmiştir. Bu salgında 23 HÜS vakası görülmüştür. Salgının sosis tüketiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir (61). 1999’da ABD’nin Teksas eyaletinde bir kafeteryanın salata bar bölümünden salata yiyen 56 kişi de STEC O111 kaynaklı salgın hastalık meydana gelmiştir (49). 2012’de ABD’nin Oklahoma eyaletinde 341 kişinin etkilendiği, STEC O111 kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Bu salgında 70 kişi hastanede tedavi görmüş, 1 kişi yaşamını yitirmiştir. Yapılan çalışmalarda salgının kaynağının, gıda hazırlık ekipmanları olduğu ya da gıda çalışanları ve gıdalar arasında çapraz bulaşmanın bu salgına neden olduğu olduğu tespit edilmiştir (62).

STEC O121

STEC O121 serogrubu, HÜS ya da HK hastalarından izole edildiği için, Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak sınıflandırılmaktadır (53).

1999 yılında ABD’de meydana gelen STEC O121:H9 kaynaklı salgında, 11 vaka meydana gelmiş ve bu vakalar arasında HÜS gerçekleşen hastalar da tespit edilmiştir. Enfeksiyona göl suyunun sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (63). 2009 yılında Japonya’da bir anaokulunda STEC O121 kaynaklı, 31 kişinin etkilendiği, kişiden kişiye temas sonucu oluşan salgın meydana gelmiştir (64).

2013 yılında ABD’de STEC O121:H19 kaynaklı, toplam 19 eyaleti kapsayan salgında 35 vaka bildirilmiş, 2 vakada HÜS gelişmiştir. Salgına bir markaya ait dondurulmuş gıda ürünlerinin sebep olduğu açıklanmıştır (41).

ABD’de tespit edilen en güncel STEC O121 salgını, 2022 yılında meydana gelmiştir. Bu salgın toplam 6 eyalette 24 kişiyi etkilemiş, 5 kişi hastanede tedavi altına alınmıştır. Salgına dondurulmuş falafelin sebep olduğu tespit edilmiştir (65).

STEC O145

STEC O145 serogrubu, dünya çapında görülebilen, HÜS ve HK’nin önemli nedenlerinden biridir. Bilinen ilk STEC O145 kaynaklı salgın, 1984’te Japonya’da meydana gelmiştir (66).

2007’de Belçika’da dondurmada meydana gelen, 13 vakanın ve 5 HÜS’ün gerçekleştiği STEC O26 ve STEC O145 kaynaklı bir salgın rapor edilmiştir (43). 2008 yılında Japonya’da kişiden kişiye temas sonucu, STEC O145 kaynaklı 13 kişinin etkilendiği bir salgın meydana gelmiştir (64). 2010 yılında ABD’de toplam 5 eyalette, 26’sı doğrulanmış 7’si olası toplam 33 vakanın görüldüğü STEC O145 kaynaklı salgında, 3 kişide HÜS görülmüştür. Salgının bir gıda işleme tesisinden alınan ambalajlı ve doğranmış marul paketlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (67). 2012 yılında ABD’de meydana gelen, toplam 9 eyalette 18 vakanın görüldüğü STEC O145 kaynaklı salgında, 4 kişi hastanede tedavi görmüş ve 1 kişi ölmüştür. Yapılan çalışmalarda salgının kaynağı net bir şekilde tespit edilememiştir (68).

KORUNMA VE KONTROL

STEC enfeksiyonlarının oluşumunu önlemek için hayvan sürülerinin doğru şekilde yönetimi ve güçlü gıda güvenilirliği sistemleri oluşturmak için çaba sarf edilmelidir. Bakteriyofajlar, kolisinler, prebiyotikler, sinebiyotikler gibi hastalığın yükünü azaltmak için farklı etkili müdahale stratejileri geliştirmeye çalışılmalıdır. Çiftliklerde rezervuar hayvanlardan bakteri saçılımını önlemek için aşı kullanımı üzerine çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle mezbahalarda ve kesim ünitelerinde HACCP uygulamalarının devamlılığı sağlanmalı ve kesim sonrası karkaslara ve sakatata dekontaminasyon uygulamaları yapılmalıdır. Gıda kaynaklı kontaminasyonları önlemek için gıdanın çeşidine göre duyuşal özelliklerinde değişiklik yapmayan, kullanımı toksisiteye neden olmayan, pastörizasyon ve ısınlama gibi çeşitli fiziksel prosedürler, klor dioksit, peroksiasetik asit; sodyum hipoklorit; ve laktik, asetik ve sitrik asit gibi organik asitler gibi kimyasal ajanların kullanımı için çalışmalar yapılmalıdır (69,70).

STEC enfeksiyonlarını önlemek için çiğ eti, özellikle de kıymayı kan ve sularının diğer yiyeceklerle damlamasını önlemek için satın alınan noktalarda ayrı plastik torbalara sarmak gerekir. Alışveriş sonrası etleri mümkün olduğunca hızlı bir şekilde buzdolabına koymak kritik öneme sahiptir. Pişmiş yiyecekler, daha önce çiğ dana eti, kanatlı eti, domuz eti, balık veya deniz ürünleri içeren yıkanmamış bir tabağa asla koyulmamalıdır. Dana eti, kanatlı eti, domuz eti, balık veya deniz ürünleri hazırlamak için kullanılan kesme tahtaları ve tezgahlar, diğer yiyeceklerle çapraz kontaminasyonu önlemek için kullanımdan hemen sonra yıkanıp dezenfekte edilmelidir. Çiğ veya az pişmiş et yemekten kaçınılmalıdır. Pişmiş yiyeceklerin sıcaklığı mutlaka bir et termometresiyle kontrol edilmelidir. Tavuk eti için 74°C, dana eti ve hamburger için 71.2°C, domuz eti için 65.6°C, yumurta için 62.8°C, diğer gıdalar için 60°C veya daha yüksek sıcaklıklara ulaşan yiyecekler tam pişmiş olarak kabul edilmelidir. Pastörize edilmemiş süt ve meyve suyu içmekten kaçınılmalıdır. Çiğ yenecek olan meyve

ve sebzeler doğru bir şekilde yıkanmalıdır. Yemek hazırlamadan önce, sonra ve yemek yemeden önce; tualeti kullandıktan, bebeklerin ve bakım altındaki yaşlıların bezleri değiştirildikten sonra; evde, çiftliklerde ve hayvanat bahçelerinde herhangi bir hayvan ile temas edildikten sonra eller dezenfektanlı sabun ile etkin bir şekilde en az 20 saniye süreyle yıkanmalıdır. Arıtılmamış kaynaklardan su içilmemeli, göller, dereler ve yüzme havuzlarında su yutmaktan kaçınılmalıdır (69,70).

SONUÇ

Son yıllarda insanlarda O157 dışı STEC enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır. O157 dışı *E. coli* serogruplarının fenotipik ve genetik çeşitliliği bu patojenlerin *in vivo* ve *in vitro* araştırılması için güvenilir ve doğru yöntemlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, bu tehlikenin göz önünde tutulup fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu enfeksiyöz ajanların rezervuar hayvanlardan insanlara bulaşmasına dikkat çekilmelidir. Gıda kaynaklı bu enfeksiyöz ajanların gıda zincirine kontaminasyonunu önlemek için yenilikçi müdahale stratejileri oluşturulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. WHO (World Health Organization) (2015). World Health Day 2015: From Farm to Plate, Make Food Safe. <https://www.who.int/news/item/02-04-2015-world-health-day-2015-from-farm-to-plate-make-food-safe>. Erişim tarihi: 29.11.2024
2. WHO (World Health Organization) (2022). Food Safety. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Erişim tarihi: 29.11.2024
3. WHO (World Health Organization) (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Erişim tarihi: 29.11.2024
4. Jung J, Bir C, Widmar NO, Sayal P (2021). Initial reports of foodborne illness drive more public attention than do food recall announcements. *J Food Prot.*, 84(7):1150-1159.
5. Sharif MK, Javed K, Nasir A (2018). Foodborne Diseases. Academic Press
6. Sağlam D, Şeker E (2016). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kocatepe Vet J.*, 9(2):105-113.
7. Assefa A, Bihon, A (2018). A systematic review and meta-analysis of prevalence of *Escherichia coli* in foods of animal origin in Ethiopia. *Heliyon*, 4(8):Article e00716.
8. Erol İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara.
9. Elitok B, Bingüler N (2018). Kanatlılarda *Escherichia coli* enfeksiyonları. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, 11(1):34-38.
10. Vasan A (2014). Thermal tolerance characteristics of non-O157 shiga-toxigenic *Escherichia coli* in meat systems. Doktora Tezi. University of Wisconsin – Madison.
11. Erkmen O (2013). Gıda Mikrobiyolojisi. Efil Yayınevi, Ankara
12. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A (2021). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: virulence factors and antibiotic resistance. *Pathogens*. 10(11):1355.
13. Welinder-Olsson C, Kaijser B (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand J Infect Dis*. 37(6-7):405-416.
14. Biliński P, Kapka-Skrzypczak L, Posobkiewicz M, Bondaryk M, Hołownia P, Wojtyła A (2012). Public health hazards in Poland are posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. *Ann Agric Environ Med.*, 19(1):3-10.

15. Samie A (2017). *Escherichia coli* Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. IntechOpen.
16. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2023). The European Union one health 2022 zoonoses report. *EFSA Journal*, 21(12):Article e8442.
17. Etcheverría AI, Padola NL (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*, 4(5):366–372.
18. Söderlund R, Hedenström I, Nilsson A, Eriksson E, Aspán A. (2012). Genetically similar strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from sheep, cattle and human patients. *BMC Vet Res.*, 8:200.
19. Detzner J, Pohlentz G, Müthing J (2022). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and a fresh view on shiga toxin-binding glycosphingolipids of primary human kidney and colon epithelial cells and their toxin susceptibility. *Int J Mol Sci.*, 23(13):6884.
20. Dewsbury DMA, Cernicchiaro N, Sanderson MW, Dixon AL, Ekong PS (2022). A systematic review and meta-analysis of published literature on prevalence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups (O26, O45, O103, O111, O121, and O145) and virulence genes in feces, hides, and carcasses of Pre- and Peri-harvest cattle worldwide. *Anim Health Res Rev.*, 23(1):1-24.
21. Levinson W (2008). Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji (B Esen, Çev., B Şener, Çev.). Öncü Basımevi, Ankara.
22. El-Baz R, Said HS, Abdelmegeed ES, Barwa, R. (2022). Characterization of virulence determinants and phylogenetic background of multiple and extensively drug resistant *Escherichia coli* isolated from different clinical sources in Egypt. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 106(3):1279–1298.
23. Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco J, Blanco J, Parro V (2006). STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity Island of human and animal shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem.*, 52(2):192–201.
24. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa, AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing stx Nomenclature. *J Clin Microbiol.*, 50(9):2951–2963.
25. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2014). Questions and Answers. <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
26. Rosove MH (2014). Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis Rheum.* 43(6):797–805.
27. Bolton DJ, Ennis C, Brain B, Monaghan A (2009). Serogroups and virulence genes in verocytotoxigenic *Escherichia coli* on beef farms and in the beef abattoir. Advancing Beef Safety Through Research and Innovation, 59. March 25-26, Dublin, Ireland.
28. Brás A, Braz M, Martinho I, Duarte J, Pereira C, Almeida A (2024). Effect of bacteriophages against biofilms of *Escherichia coli* on food processing surfaces. *Microorganisms*, 12(2):366.
29. Costigan C, Raftery T, Carroll AG et al. (2022). Neurological involvement in children with hemolytic uremic syndrome. *Eur J of Pediatr.*, 181:501–512.
30. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C (2017). Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 390(10095):681–696.
31. Harkins VJ, McAllister DA, Reynolds BC (2020). Shiga-toxin *E. coli* hemolytic uremic syndrome: Review of management and long-term outcome. *Curr Pediatr Rep.*, 8(1):16–25.
32. Kalalah AA, Koenig SSK, Bono JL, Bosilevac JM., Eppinger M (2024). Pathogenomes and virulence profiles of representative big six non-O157 serogroup shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.*, 15:(1364026).
33. Valilis E, Ramsey A, Sidiq S, DuPont HL (2018). Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*-A poorly appreciated enteric pathogen: Systematic Review. *Int J Infect Dis.*, 76:82-87.
34. Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ (2011). Serotypes and virulence profiles of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *App Environ Microbiol.*, 77(24):8662–8668.
35. Bosilevac JM, Koohmaraie M (2011). Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Commercial ground beef in the United States. *Appl Environ Microbiol.*, 77(6):2103–2112.
36. USDA (United States Department of Agriculture) (2011). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products, <https://www.federalregister.gov/documents/2011/11/23/2011-30271/shiga-toxin-producing-escherichia-coli-in-certain-raw-beef-products>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
37. Carbonari, C. C., Miliwebsky, E. S., Zolezzi, G., Deza, N. L., Fitipaldi, N., Manfredi, E., Baschkier, A., D'Astek, B. A., Melano, R. G., Schesi, C., Rivas, M., & Chinen, I. (2022). The importance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM[H28]/H28 infections in Argentina, 1998–2020. *Microorganisms*, 10(3), 582.
38. Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, Sonntag AK, Karch H (2005). Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *J Clin Microbiol.*, 43(8):4225–4228.
39. Durso LM, Bono JL, Keen JE (2005). Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol.*, 71(8):4941–4944.
40. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2012). Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 infections linked to raw clover sprouts at Jimmy John's Restaurants (Final Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2012/o26-02-12/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024
41. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2013). Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 infections linked to farm Rich Brand frozen food products (Final Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2013/o121-03-13/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024
42. Rodwell, EV, Simpson A, Chan YW, Godbole G, McCarthy ND, Jenkins C. (2023). The epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 (clonal complex 29) in England, 2014–2021. *J Infect.*, 86(6):552-562.
43. De Schrijver K, Buvens G, Possé B, Van den Branden D, Oosterlynck O, De Zutter L, Eilers K, Piérard D, Dierick K, Van Damme-Lombaerts R, Lauwers C, Jacobs R (2008). Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Euro Surveill.*, 13(7):8041.
44. Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T, Mølbak K (2007). An outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Euro Surveill.*, 12(22):3208.
45. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2016). Multistate outbreaks of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 infections linked to chipotle Mexican grill restaurants (Fi-

- nal Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o26-11-15/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
46. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2016). Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections linked to flour (Final Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o26-11-15/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 47. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2018). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Beef. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o26-09-18/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 48. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2019). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Flour. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2019/flour-05-19/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 49. Brooks JT, Bergmire-Sweat D, Kennedy M, Hendricks K, Garcia M, Marengo L, Wells J, Ying M, Bibb W, Griffin PM, Hoekstra RM, Friedman CR (2004). Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp. *Clin Infect Dis.*, 38(2):190–198.
 50. Schaffzin JK, Coronado F, Dumas NB et al. (2012). Public health approach to detection of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Summary of two outbreaks and laboratory procedures. *Epidemiol Infect.*, 140(2):283–289.
 51. Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK (2014). Outbreaks of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect.*, 142(11):2270–2280.
 52. FSA (Food Standards Agency) (2023). FSA and UKHSA warn of the possible presence of *E.coli* in various Mrs Kirkham's Lancashire Cheese. <https://www.food.gov.uk/news-alerts/news/fsa-and-ukhsa-warn-of-the-possible-presence-of-e-coli-in-various-mrs-kirkhams-lancashire-cheese>. Tarihi:29.11.2024.
 53. Fratamico PM, DebRoy C, Strobaugh TP Jr, Chen CY (2005). DNA Sequence of the *Escherichia coli* O103 O Antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the wzx and wzy genes. *Can J Microbiol.*, 51(6):515–522.
 54. Sekse C, Sunde M, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, Urdahl AM (2013). Occurrence of Potentially Human-Pathogenic *Escherichia coli* O103 in Norwegian Sheep. *Appl Environ Microbiol.*, 79(23):7502–7509.
 55. Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM et al. (2008). Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis.*, 8:41.
 56. Mylius M, Dreesman J, Pulz M et al. (2018). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 Outbreak in Germany after school Trip to Austria due to raw cow milk, 2017 - The important role of international collaboration for outbreak investigations. *Int J Med Microbiol.*, 308(5):539–544.
 57. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2019). Outbreak of *E. coli* infections linked to ground beef. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o103-04-19/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 58. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2019). Outbreak of *E. coli* infections linked to ground bison produced by Northfork Bison Distributions, Inc. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2019/bison-07-19/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 59. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2020). Outbreak of *E. coli* infections linked to clover sprouts. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2020/o103h2-02-20/index.html>. Erişim Tarihi: 29.11.2024.
 60. Viljanen, M. K., Peltola, T., Kuistila, M., Huovinen, P., Junnila, S. Y. T., Olkkonen, L., & Järvinen, H. (1990). Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111: B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet*, 336(8719), 831–834.
 61. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1995). Community Outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome Attributable to *Escherichia coli* O111:NM--South Australia 1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44(29):550–558.
 62. Bradley KK, Williams JM, Burnsed LJ, Lytle MB, Mcdermott MD, Mody RK, Bhattarai A, Mallonee S, Piercefield EW, Mcdonald-Hamm CK, Smithee LK (2012). Epidemiology of a large restaurant-associated outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:NM. *Epidemiol Infect.*, 140(9):1644–1654.
 63. McCarthy TA, Barrett NL, Hadler JL, Salisbury B, Howard RT, Dingman DW, Brinkman CD, Bibb WF, Cartter ML (2001). Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics*, 108(4):59.
 64. NIID (National Institute of Infectious Diseases) (2009). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2009. *Infectious Agents Surveillance Report*, 30(5):119–120.
 65. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2022). *E. coli* outbreak linked to frozen falafel. <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2022/o121-10-22/index.html>. Erişim tarihi: 29.11.2024.
 66. Taylor EV, Nguyen TA, Machesky KD et al. (2013). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with Romaine lettuce consumption, 2010. *J Food Prot.*, 76(6):939–944.
 67. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2010). Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded Romaine lettuce from a Single processing Facility (Final Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2010/shredded-romaine-5-21-10.html>. Erişim tarihi: 29.11.2024.
 68. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2012). Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145 infections (Final Update). <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/ecoli/2012/o145-06-12/index.html>. Erişim tarihi: 29.11.2024.
 69. Alharbi MG, Al-Hindi RR, Esmael A, Alotibi IA, Azhari SA, Al-seghayer MS, Teklemariam AD (2022). The "Big Six": Hidden emerging foodborne bacterial pathogens. *Trop Med Infect Dis.*, 7(11):356.
 70. New York State, Department of Health (2024). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections. <https://www.health.ny.gov/diseases/communicable/ecoli/stec.html>. Erişim Tarihi: 10.10.2024.