



Koenzim Q10 ve Hesperidinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi

Betül APAYDIN YILDIRIM^{1a}✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

ORCID: 0000-0002-0361-6148^a

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.08.2022	06.09.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Apaydın Yıldırım B: Koenzim Q10 ve Hesperidinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 90-95, 2022.

Öz: Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon (İR) hasarında Koenzim Q10 (CoQ10) ve Hesperidinin (HESP) TAS ve TOS düzeylerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 28 adet 200-250 gr ağırlığında Sprague- Dawley erkek ratlar; Kontrol (K), İskemi reperfüzyon (İR), İR+CoQ10 ve İR+HESP grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İR+CoQ10 grubuna iskemi oluşturulmadan önce 10mg/kg dozunda 8 saat arayla 3 kez 0.5mL CoQ10, İR+HESP grubuna ise 100mg/kg dozunda 8 saat arayla 3 kez 0.5mL Hesperidin gastrik gavaj ile verildi. Kontrol grubu hariç diğer 3 gruba anestezi altında sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı. Çalışma sonunda ratlardan anestezi altında kan örnekleri alınarak total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan statü (TOS) düzeyleri ölçüldü. İR grubunda TOS düzeyi tüm gruplardan yüksek iken, iskemi ile birlikte CoQ10 ve HESP uygulamasının bu düzeyleri İR grubuna göre anlamlı olarak düşürdüğü, TAS düzeylerini ise iskemi ile birlikte uygulanan antioksidanların İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yükselttiği tespit edildi. Sonuç olarak ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında CoQ10 ve HESP TOS düzeyini azaltarak, TAS düzeyini arttırarak oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hesperidin, İskemi, Koenzim Q10, Reperfüzyon, Turnike.

The Effect of Coenzyme Q10 and Hesperidin on TAS and TOS Levels in Lower Extremity Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Abstract: It was aimed to determine the effects of Coenzyme Q10 (CoQ10) and Hesperidin (HESP) on TAS and TOS levels in lower extremity ischemia-reperfusion (IR) injury. In the study, 28 Sprague-Dawley male rats weighing 200-250 g were divided into 4 groups as Control (C), Ischemia reperfusion (IR), IR+CoQ10 and IR+HESP groups. Before ischemia was induced in the IR+CoQ10 group, 0.5mL CoQ10 was administered at a dose of 10mg/kg 3 times with 8-hour intervals, and to the IR+HESP group at a dose of 100mg/kg, 0.5mL Hesperidin was administered 3 times at 8-hour intervals by gastric gavage. Except for the control group, a tourniquet was applied to the left lower extremities and 2 hours of ischemia and 2 hours of reperfusion were applied to the other 3 groups under anesthesia. At the end of the study, blood samples were taken from the rats under anesthesia and total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) levels were measured. While TOS level was higher in the IR group than in all groups, it was determined that CoQ10 and HESP application with ischemia significantly decreased these levels compared to the IR group, and antioxidants applied together with ischemia increased the TAS levels statistically significantly compared to the IR group. It was determined that it showed protective effects by decreasing the CoQ10 and HESP TOS level and increasing the TAS level in experimentally induced ischemia-reperfusion injury of the lower extremity in rats.

Keywords: Coenzyme Q10, Hesperidin, Ischemia, Reperfusion, Tourniquet.

✉ Betül APAYDIN YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: betul_apaydin@hotmail.com

GİRİŞ

Turnike, distalde kalan dokulara kan akışının engellenmesi ve nöromusküler yapılara mekanik olarak etki eden ve fizyolojik olmayan bir uygulama olmasına rağmen ameliyat süresini kısaltmak, kan kaybını azaltmak ve kansız bir ortamda cerrahi işlemleri kolaylaştırmak için ekstremite sıklıkla kullanılan bir uygulamadır. Turnike uygulamasına bağlı olarak ekstremite iskemisi/reperfüzyon hasarı, vasküler yaralanmalar, tromboemboli, paralizler ve kompartman sendromu mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Turnike kullanımı sıklıkla şiddetli ekstremite kanamasının tedavisinde kullanılan birincil uygulamadır.

Bir dokudaki kan akımının herhangi bir sebeple durması, dokunun ihtiyacı olan metabolitlerin ve oksijenin temin edilememesi durumu iskemisi olarak tanımlanır. Reperfüzyon ise kan akımının durduğu dokuda kan akımının yeniden sağlanması olarak tanımlanır. İskemi esnasında hücresel fonksiyon bozukluğu, toksik metabolitlerin hücrelerde birikmesi ve nekroz gibi durumlar birtakım biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesiyle iskemisinin gerçekleştiği dokularda arteriyel kan ile bolca oksijen gelmesiyle serbest radikallerin ve oksidatif kapasitesi yüksek moleküllerin miktarlarının artışına sebep olur. Hücrelerde oluşan serbest oksijen radikalleri ve hücre organellerini, membran proteinlerini, lipitlerini ve nükleik asitleri oksidasyona uğratarak, hasara yol açarak oksidatif strese neden olurlar (Basmacı, 2017; Bayrak, 2017; Kılıç, 2014). Total antioksidan statü (TAS) plazma ve vücut sıvılarındaki tüm antioksidanların etkisini gösterirken, total oksidan statü (TOS) tüm oksidanların toplam etkisini gösterir (Aslan ve ark., 2014).

Alt ekstremite iskemisi reperfüzyon (İR) hasarı, aort cerrahisinde başta olmak üzere miyokard infarktüsü, serebrovasküler olaylar, sepsis, organ transplantasyonu, şok, yanık, periferik ve mezenter arter embolilerinde uygulanan trombolitik tedaviler, pankreatit gibi cerrahi ve travmatik durumlarda ortaya çıkan iskemisinin ve hipovoleminin tedavisi

sırasında oluşurken cerrahi girişim esnasında ekstremitelere yapılan turnikeler reperfüzyon hasarı sebeplerindedir (Eltzschig & Eckle, 2011).

Kırmızı et ve deniz ürünlerinde bulunan Koenzim Q10 (CoQ10), meyve (özellikle turuncu kabuklarında) ve sebzelerde bulunan antioksidan olan Hesperidin (HESP) ve flavonoidleri antioksidan, antialerjik, antiinflamatuvar, antikanser, antiapoptotik ve antiiskemik olarak etki göstermektedir (Ertekin & Apaydın Yıldırım, 2018; Akbulut ve ark., 2019). CoQ10 oksidatif stresi önler, ATP sentezinde önemli rol oynar, İR sırasında oksidatif strese oluşan hasarı önler, proteinlerin ve lipidlerin peroksidasyonunu önler (Akbulut ve ark., 2019). Hesperidin diğer flavonoidlerden farklı olarak 3 OH grubuna sahip olarak en güçlü antioksidan potansiyeline sahiptir (Kara ve ark., 2014).

Ekstremitte akut İR yaralanmalarından sorumlu hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak ortaya konulmamıştır. Bazı çalışmalar, akut İR sırasında hasarlı iskelet kaslarında inflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminin, nöronal hasara ve iskelet kası fonksiyon eksikliğine neden olduğunu göstermiştir (Eltzschig & Eckle, 2011). İR hasarının önlenmesinde birçok antioksidan madde kullanılmaktadır. Koenzim Q10 ve Hesperidin bioflavonoid oldukları için oksidatif hasara karşı koruyucu oldukları kanıtlanan antioksidan aktiviteye sahiptirler ve süperoksit gibi reaktif nitrojen ve oksijen türlerini ortadan kaldırıcı etkiye sahiptirler.

Şimdiye kadar kas dokusunda turnikeye bağlı iskemisi/reperfüzyon hasarını azaltmak için birtakım kimyasallar, ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir. Bu doğrultuda da uzun yıllardır yararlı etkileri bilinen sentetik ve bitkisel olan antioksidan maddelerin etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, Koenzim Q10 ve Hesperidin uygulanan ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremite iskemisi-reperfüzyon hasarının TAS ve TOS düzeylerine etkileri incelendi.

MATERYAL ve METOT

Deney Materyallerinin Temini

Çalışmada antioksidan olarak kullanılan Koenzim Q10 (SOLGAR) ve Hesperidin (Sigma Aldrich St Louis, USA) piyasadan temin edildi. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 36643897-000-E-1800090274/59 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra deneyde 28 adet Sprague Dawley 200-250 g erkek rat Atatürk Üniversitesi'ne bağlı Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından sağlandı. Ratların canlı ağırlıkları tartılarak gruplar oluşturuldu. Ratlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusunda, 21°C (+/-2) ortamda 7 gün ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra denemeye başlandı. Ratlar su ve pelet yem ile ad libitum beslendi. Ratlar; Kontrol Grubu (K), İskemi/Reperfüzyon Grubu (İ/R Grubu), İ/R+CoQ10 Grubu, İ/R+Hesperidin Grubu olmak üzere rastgele seçilip kafeslere yerleştirildi. Opere edilecek ratlar bir gece önce aç bırakıldı ama suya erişimleri serbest bırakıldı. Tüm ratlar Ksilazin (8 mg/kg) ve Ketamin (60 mg/kg) anestezi altına alındı, kontrol grubu hariç diğer 3 gruba anestezi altında sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı.

Deneysel Uygulamalar

Kontrol Grubu: İskemi oluşturulmadan önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL % 0.25'lik CMC gastrik gavaj ile uygulandı. İR oluşturulmaksızın anestezi altında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR Grubu: Anestezi altına alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu (pençelerin siyanotik olması ve sıcaklığın düşük olması iskeminin gerçekleştiğini gösterdi), iki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR+CoQ10 Grubu: İskemiden önce ratlara önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL 10mg/kg CoQ10 (%0.25'lik CMC içerisinde çözüldü) gastrik gavaj ile uygulandı. Otuz dakika sonra alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu. İki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR+Hesperidin Grubu: İskemiden önce ratlara önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL 100mg/kg HESP (%0.25'lik CMC içerisinde çözüldü) gastrik gavaj ile uygulandı. Otuz dakika sonra alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu, iki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için lityum heparinli tüplere alınan kan 10 dakika 3000rpm'de santrifüj edilerek plazmaları çıkartılıp biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Elde edilen plazmalarda TOS ve TAS düzeylerine (Rel Assay) ticari olarak alınan ELİSA kitinde belirtilen protokol uygulanarak Biotek ELISA Reader (Bio Tek µQuant MQX200 Elisa reader/USA) ile ölçümler gerçekleştirildi. TAS düzeyinin ölçülmesinden sonra OSİ hesaplanması için TAS birimi µmol'e çevrilerek aşağıda bulunan formüle göre hesaplamalar yapıp OSİ sonuçları arbitrary unit (AU) şeklinde belirtildi.

OSİ= (TOS, µmol H₂O₂ Equ./L / TAS, mmol Trolox Equ./L) X 100

İstatistiksel analizler: Elde edilen sonuçların istatistik değerlendirilmesi SPSS 22.00 paket programı kullanılarak normal dağılıma uygunluğuna bakıldı. Veriler normal dağılım gösterdiği için One-Way ANOVA analizi yapıldı. One-Way ANOVA analizi

sonucunda grupların homojen olduğu belirlenerek tüm gruplar arasındaki farklılığın çoklu karşılaştırılması için Tukey testi yapıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmada $p < 0.05$ önemli olarak kabul edildi. Ortalama \pm standart hata olarak belirtildi.

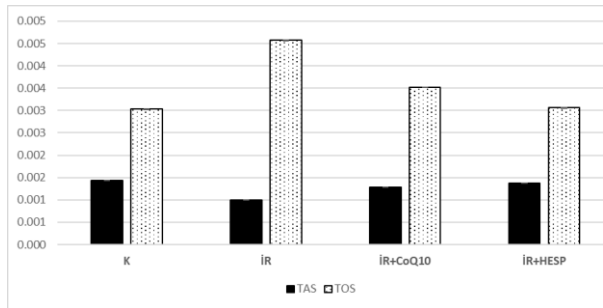
BULGULAR

İR grubunda plazma TOS düzeyi kontrol grubuna göre yükselirken, İR+CoQ10 ve İR+HESP gruplarında TOS düzeyi İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptandı ($p < 0.001$). İR grubunda plazma TAS düzeyi İR+CoQ10 ve İR+HESP gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. OSİ, İR grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p < 0.001$) (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. CoQ10 ve Hesperidinin plazma TAS ve TOS düzeyleri üzerine etkisi

Table 1. Effect of CoQ10 and Hesperidin on plasma TAS and TOS levels.

Gruplar	TAS (mmol Trolox Equ./L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ EQU./L)	OSİ (AU)
K	1.43 \pm 0.00a	3.03 \pm 0.01 ^d	0.21 \pm 0.00 ^b
İR	0.99 \pm 0.00 ^d	4.57 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.00 ^a
İR+CoQ10	1.28 \pm 0.00 ^c	3.52 \pm 0.00 ^b	0.24 \pm 0.00 ^b
İR+HESP	1.38 \pm 0.00 ^b	3.06 \pm 0.01 ^c	0.22 \pm 0.00 ^b
p	***	***	***



Şekil 1. Tüm gruplarda plazma TAS ve TOS düzeyleri.

Figure 1. Plasma TAS and TOS levels in all groups.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde de tüm Dünya'da da önemli mortalite ve morbiditeye sebep olan alt ekstremite iskemisi sıklıkla görülmektedir. İR sürecinde reperfüzyonda hasarın büyüklüğü ve reaktif oksijen radikallerinin (polimorfonükleer lökositlerden serbest oksijen radikallerinin salınımı gerçekleşir) dokularda hasara yol açtığı bilinmektedir. İskelet kasları, alt ekstremite İR hasarında önemlidir. İskeminin uzun süre devam etmesi hücrelerin bütünlüğünün bozulmasına ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Tiryakioğlu ve ark., 2015).

Periferik vasküler travma, periferik vasküler cerrahi, akut arteriyel oklüzyon ve ekstremite replantasyonu esnasında ekstremite akut iskemisi ile karşılaşmak mümkündür. Reperfüzyonun sağlanmasıyla ekstremite kaybı, akut böbrek, kas, akciğer, karaciğer ve solunum yetmezliği, çoklu organ yetmezlikleri ve müdahaleler gecikirse ölüm ile sonuçlanabilmektedir. İskemik hasara en duyarlı olan doku iskelet kasıdır ve alt ekstremite İR hasarında etkilenmektedir ve reperfüzyon sürecinde kas hasarının miktarı önem taşımaktadır (Aksu ve ark., 2015).

Antioksidan ajanlar iskemi reperfüzyon hasarını önlemede ve tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. Koenzim Q10 ve hesperidin önemli antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı alt ekstremite İR hasarında terapötik bir ajan olarak kullanılabilir (Ertekin & Apaydın, 2018). Ertekin ve Apaydın (2018)'in bulguları ve yapılan çalışmanın bulguları değerlendirildiğinde CoQ10 ve HESP'nin iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, CoQ10 ve HESP oksidatif stresi azaltarak ratlarda İR'nin neden olduğu iskelet kası hasarına karşı koruyucu ve yardımcı terapötik ajanlar olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Abbas, A., Iqbal, Z., Abbas, R. Z., Khan, M. K., Khan, J. A., Mahmood, M. S., et al. (2017). In vivo anticoccidial effects of Beta vulgaris (sugar beet) in broiler chickens. *Microbial pathogenesis*, 111, 139-144.
2. Abd El Megid, A. D., Khaled, M., Emam, M. A., & Adel, A. (2018). Biochemical role of zinc oxide and propolis nanoparticles in protection rabbits against coccidiosis. *Benha Veterinary Medical Journal*, 34(1), 314-328.
3. Aboelhadid, S. M., El-Ashram, S., Hassan, K. M., Arafa, W. M., & Darwish, A. B. (2019). Hepato-protective effect of curcumin and silymarin against Eimeria stiedae in experimentally infected rabbits. *Livestock Science*, 221, 33-38.
4. Aboelhadid, S. M., Hashem, S., Abdel-Kafy, E. S., Mahrous, L. N., Farghly, E. M., Abdel-Baki, A. A. S., et al. (2021). Prebiotic supplementation effect on Escherichia coli and Salmonella species associated with experimentally induced intestinal coccidiosis in rabbits. *PeerJ*, 9, e10714.
5. Abu El Ezz, N., Aboelsoued, D., Hassan, S., Abdel Megeed, K., & El-Metenawy, T. (2020). Therapeutic effect of Moringa oleifera and Thymus vulgaris oils against hepatic coccidiosis in experimentally infected rabbits. *Tropical Biomedicine*, 37(4), 1018-1028.
6. Ayan, A., Ahmed, I., Khan, J. M., Munir, S., Hussain, M., Khan, A. K., et al. (2020). Hematological changes and comparative efficacy of allopathic and herbal drugs on coccidiosis in rabbits. *Baltica*, 33(2), 78-99.
7. Benato L, Hastie P, O'Shaughnessy P, Murray JA, Meredith A. Effects of probiotic Enterococcus faecium and Saccharomyces cerevisiae on the faecal microflora of pet rabbits. *J Small Anim Pract*. 2014 Sep;55(9):442-6.
8. Çam, Y., Atasever, A., Eraslan, G., Kibar, M., Atalay, Ö., Beyaz, L., et al. (2008). Eimeria stiedae: experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. *Experimental parasitology*, 119(1), 164-172.
9. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
10. El-Ashram, S. A., Aboelhadid, S. M., Abdel-Kafy, E.-S. M., Hashem, S. A., Mahrous, L. N., Farghly, E. M., et al. (2019). Prophylactic and therapeutic efficacy of prebiotic supplementation against intestinal coccidiosis in rabbits. *Animals*, 9(11), 965.
11. El-Ghoneimy, A., & El-Shahawy, I. (2017). Evaluation of amprolium and toltrazuril efficacy in controlling natural intestinal rabbit coccidiosis. *Iranian journal of veterinary research*, 18(3), 164.
12. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol*. 2017 Aug;14(8):491-502.
13. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14.
14. Indrasanti, D., Indradji, M., Hastuti, S., Aprilliyani, E., Fatikha, F., & Rosyadi, K. (2017). The administration of garlic extract on Eimeria stiedae oocysts and the hematological profile of the coccidia infected rabbits. *Media Peternakan*, 40(3), 158-164.
15. Jahangiri, F., Razavi, S., & Nazifi, S. (2018). Comparative effect of Melissa officinalis

- aqueous extract, sulfadimidine, and vitamin E–selenium on antioxidant parameters in rabbit experimental coccidiosis. *Comparative Clinical Pathology*, 27(2), 371-378.
16. KN, A. M., NM, A. E., & Abdel-Rahman, E. H. (2005). Protective effect of *Eimeria stiedae* coproantigen against hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35(2), 581-595.
 17. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12791-12835.
 18. Ogolla, K. O., Gathumbi, P. K., Waruiru, R. M., Okumu, P. O., Chebet, J., & Kitala, P. M. (2018). Efficacy of sulphachloropyrazine, amprolium hydrochloride, trimethoprim-sulphamethoxazole, and diclazuril against experimental and natural rabbit coccidiosis. *Journal of veterinary medicine*, 2018.
 19. Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A. Z., & Alberti-Navarro, A. B. (2016). Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Veterinary parasitology*, 232, 58-65.
 20. Petrova, Y. (2019). Pasteurellosis And Emeriosis–Worldwide Problems In The Rabbit Farms: A Review. *Trakia Journal of Sciences*, 17(1), 67.
 21. Pourali, M., Kermanshahi, H., Golian, A., Razmi, G. R., & Soukhtanloo, M. (2014). Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(3), 227-232.
 22. Qamar, F., Sharif, R., Qamar, M., & Basharat, A. (2013). Comparative efficacy of sulphadimidine sodium, toltrazuril and amprolium for coccidiosis in rabbits. *Science International (Lahore)*, 25(2), 295-298.
 23. Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.
 24. Rivero-Perez, N., Hernández-Alvarado, J. L., Valladares-Carranza, B., Delgadillo-Ruiz, L., Ojeda-Ramírez, D., Sosa-Gutiérrez, C. G., et al. (2019). *Salix babylonica* L. as a natural anticoccidial alternative in growing rabbits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
 25. Sivajothi, S., Reddy, B. S., & Rayulu, V. (2014). Intestinal coccidiosis infection in domestic rabbits. *International Journal of Biological Research*, 2(2), 48-50.
 26. Sivajothi, S., Reddy, B. S., & Rayulu, V. (2016). Study on impression smears of hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3), 906-909.
 27. Sorour, S. S., Abou Asa, S., Elhawary, N. M., Ghazy, E. W., Abd El Latif, A., El-Abasy, M. A., et al. (2018). Anticoccidial and hepatoprotective effects of artemisinin liquid extract, cinnamon essential oil and clove essential oil against *Eimeria stiedae* infection in rabbits. *Tropical biomedicine*, 35(4), 926-943.
 28. Worku, M., Franco, R., & Baldwin, K. (2009). Efficacy of garlic as an anthelmintic in adult Boer goats. *Archives of Biological Sciences*, 61(1), 135-140.